

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
FEDERICO II
DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA**

**DOTTORATO DI RICERCA IN
“BIOLOGIA AVANZATA”
INDIRIZZO SISTEMATICA MOLECOLARE
XXVII CICLO**

Settore disciplinare: BIO/01

TESI DI DOTTORATO

**Studio della struttura genetica delle popolazioni di
Cyanidiophyceae (Rhodophyta)**

Dottorando:

Tutor:

Cotutor:

Coordinatore del corso:

Dott.ssa Manuela Iovinella

Ch.mo Prof. Paolo Caputo

Ch.mo Prof. Gabriele Pinto

Ch.mo Prof. Luciano Gaudio

Anno accademico 2013/2014

1. INTRODUZIONE.....	4
1.1 GLI AMBIENTI ESTREMI	5
1.2 LE ALGHE DI AMBIENTI ESTREMI.....	8
1.3 <i>CYANIDIOPHYCEAE</i> (RHODOPHYTA).....	9
1.3.1 ASPETTI FILOGENETICI DELLE <i>CYANIDIOPHYCEAE</i>	11
1.3.2 BIOGEOGRAFIA DELLE <i>CYANIDIOPHYCEAE</i>	13
2. SCOPO DEL LAVORO.....	16
3. MATERIALI E METODI.....	19
3.1 DESCRIZIONE DEI NUOVI SITI DI CAMPIONAMENTO.....	20
3.1.1 ISLANDA: CARATTERISTICHE GEOGRAFICHE E GEOLOGICHE.....	20
3.1.2 DESCRIZIONE DEI SITI DI CAMPIONAMENTO ISLANDESI.....	20
3.2.1 TURCHIA: VULCANISMO E STORIA GEOLOGICA.....	22
3.2.2 DESCRIZIONE DEI SITI DI CAMPIONAMENTO TURCHI.....	23
3.2 CAMPIONAMENTO.....	25
3.3 ESTRAZIONE E PCR.....	25
3.4 ANALISI DEI DATI.....	26
4. RISULTATI.....	29
4.1 FILOGENESI DELL' <i>rbcL</i> E BIODIVERSITÀ DELLE <i>CYANIDIOPHYCEAE</i> ISLANDESI E TURCHE.....	30
4.2 VALUTAZIONE DELLE LINEE EVOLUTIVE DEL GENERE <i>GALDIERIA</i>	40
4.2.1 <i>GALDIERIA SULPHURARIA</i>	43
4.2.1.1 STATISTICA DI POPOLAZIONE DI <i>G. SULPHURARIA</i>	43
4.2.1.2 NETWORK DI APLOTIPI E NCA PER <i>G. SULPHURARIA</i>	44
4.2.2 <i>GALDIERIA MAXIMA</i>	48
4.2.2.1 STATISTICA DI POPOLAZIONE DI <i>G. MAXIMA</i>	48
4.2.2.2 NETWORK DI APLOTIPI E NCA PER <i>G. MAXIMA</i>	49
4.2.3 <i>CYANIDIOSCHYZON MEROLAE</i>	51
4.2.3.1 STATISTICA DI POPOLAZIONE DI <i>C. MEROLAE</i>	51
4.2.3.2 NETWORK DI APLOTIPI E NCA PER <i>C. MEROLAE</i>	52

4.3 VALUTAZIONE DELL'ABBASSAMENTO DEL pH DEL MEZZO ESTERNO.....	54
4.3.1 PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS (PCA).....	62
5. DISCUSSIONI.....	64
6. BIBLIOGRAFIA.....	69

1. INTRODUZIONE

1.1 GLI AMBIENTI ESTREMI

La definizione di ambiente estremo è alquanto complessa ed ancora oggi in via di ulteriore definizione. Se consideriamo gli ambienti “normali” quegli habitat con temperature tra 4 e 40°C, con valori di pH tra 5 and 8.5, ed una salinità media compresa tra quella marina e quella delle acque dolci, un ambiente “estremo” è un qualsiasi habitat contraddistinto da valori molto alti o molto bassi di tutti i principali parametri che influenzano il ciclo vitale di un organismo vivente (Oarga A., 2009); tra questi ricordiamo il pH, che determina la disponibilità degli ioni inorganici e dei metaboliti per gli organismi, la salinità, la pressione idrostatica, che ne influenza la fluidità delle membrane cellulari, le radiazioni elettromagnetiche ed ionizzanti (gli organismi si proteggono dalle radiazioni dannose attivando meccanismi che riparano le componenti cellulari danneggiate o accumulando all'interno della cellula sostanze protettive) e la temperatura, che è il più importante fattore ambientale alla base dell'attività e dell'evoluzione degli organismi viventi. Brock (1978) identificava gli **ambienti estremi** come quelli in cui esiste almeno una condizione selettiva per la quale solo alcuni organismi sono in grado di crescere e riprodursi rispetto agli altri. In particolare batteri ed alghe sono organismi che meglio di altri sanno adattarsi a condizioni ecofisiologiche estreme. Fino agli anni sessanta si pensava che la massima temperatura compatibile con la vita fosse 70°C a causa della instabilità generale delle molecole biologiche. Studi passati hanno dimostrato in vitro che a temperature superiori di 70°C si perde la struttura tridimensionale della maggior parte degli enzimi e delle proteine in generale; esiste poi un'enorme varietà di metaboliti che sono rapidamente idrolizzate a temperature superiori di 90°C (Zierenberg et al., 2000). Nel 1978, però, Brock et al hanno scoperto i primi organismi estremofili che vivono a temperature maggiori, durante un campionamento presso diverse sorgenti termali nell'area del Lower Geyser Basin: un archeobatterio, chiamato *Thermus aquaticus*, vive e si riproduce ad una temperatura di 50-80°C e ricava energia dalla fotosintesi di alcuni cianobatteri con i quali vive in simbiosi. Molti microrganismi che vivono in ambienti estremi usano l'H₂S come fonte di energia, che generalmente è tossica per la maggior parte degli esseri viventi aerobici, ma popolazioni appartenenti a questo gruppo riescono a crescere in una varietà di ambienti ricchi di zolfo e con continue emissioni di H₂S (Zierenberg et al., 2000); è questo il caso del genere *Sulfolobus*, scoperto da Brock, le cui specie vivono ad una temperatura ottimale di 85-90°C e ricavano energia dall'ossidazione di granuli di zolfo, riducendo il pH dell'ambiente circostante.

Gli ambienti termali, anch'essi considerati ambienti estremi, sono la conseguenza dell'attività vulcanica secondaria e rappresentano una condizione naturale sempre esistita e che probabilmente ha accompagnato l'evoluzione degli esseri viventi. Questi ambienti con alte temperature e alcune volte basso pH sono la condizione ottimale per la fioritura di organismi termo-acidofili, considerati gli antenati di tutte le altre forme vitali che abitano il pianeta. L'attività peculiare dei sistemi idrotermali è conseguenza del raffreddamento del magma che viene a contatto con l'acqua, principalmente piovana, nelle profondità delle rocce; con particolari condizioni di pressione e di temperatura si generano sorgenti termali, miniere sulfuree, fumarole e geysir, tipiche di questi habitat. Gli ambienti idrotermali, dove si raggiungono temperature di 100°C ed oltre e pH estremamente acidi ($\text{pH} = 0$) sono limitate a zone ristrette della superficie terrestre, tra le quali lo Yellowstone National Park (USA), l'Islanda, il Giappone, la Russia, la Nuova Zelanda (Brock, 1978) e l'Italia (Pinto & Taddei, 1977). Sulla Terra gli ambienti acidi sono molto più comuni di quelli alcalini poiché la condizione di acidità si sviluppa in condizioni ossidanti e dove quindi l'atmosfera è prevalentemente aerobica. Oltre l'ossigeno, esistono diverse molecole che contribuiscono ad abbassare il pH in questo tipo di ambienti, tra le quali l'acido solforico (H_2SO_4) è quello più abbondante: esso si forma in seguito all'ossidazione di zolfo e solfuri, quali acido solfidrico (H_2S) e pirite (FeS_2); questi gas fuoriescono dalle spaccature della roccia e, incontrando l'ossigeno atmosferico, si ossidano spontaneamente o in seguito all'attività di batteri solfo-ossidanti (*Thiobacillus thiooxidans*) a zolfo elementare e poi a acido solforico (Doemel&Brock, 1971). In alcune aree geotermali la sua concentrazione è talmente elevata da abbassare il pH a valori estremamente bassi ($\text{pH} \leq 0.0-0.5$). I diversi sistemi idrotermali presentano caratteristiche fisiche e chimiche diverse a seconda della natura e geochimica del sito e spesso sono caratterizzati dalla presenza di elevate concentrazioni di Ferro, Nichel, Alluminio e di metalli pesanti. A causa di queste estreme condizioni, questi tipo di ecosistemi sono caratterizzati da una bassa diversità di specie. Con valori di pH più bassi di 2.5 gli unici microrganismi che riescono a sopravvivere sono batteri, funghi e alcune specie algali (Brock, 1978b; Albertano, 1995). Gli ambienti idrotermali, diffusi su tutto il continente, possono essere distinti in:

- **Sorgenti di acqua sulfurea**, le cui acque hanno normalmente un pH intorno alla neutralità nonostante la produzione di H_2SO_4 e questo avviene perché l'acqua corrente diluisce e trasporta via di continuo tutto l'acido appena formato. Quando però la concentrazione di H_2S aumenta, l'azione dei solfobatteri diventa cospicua soprattutto sulle sponde del ruscello, con conseguente abbassamento del pH del suolo. Condizioni particolarmente

favorevoli affinché ciò possa manifestarsi, si hanno quando la sorgente sfocia in una grotta dove si favorisce il ristagno dell'acqua e quindi di idrogeno solforato, punto di partenza per la formazione di H_2SO_4 .

- **Putizze**, termine usato di solito per indicare una forte emissione gassosa (H_2S) facilmente percettibile con l'olfatto. Nella maggior parte dei casi, la putizza ha sede in un avvallamento del terreno, diventando un punto di raccolta dell'acqua piovana. All'interno di queste pozze i solfobatteri si moltiplicano ed esplicano la loro funzione di ossidare il H_2S , abbassando conseguentemente il pH.
- **Fumarole** quando si verificano emissioni gassose di vapore acqueo misto ad altri gas, incluso l' H_2S , che raggiungono temperature di oltre 100°C , condizione proibitiva per lo sviluppo di qualsiasi forma vitale; ne sono un esempio le fumarole della Solfatara di Pozzuoli (Italia).
- **Zolfare**, terreni acidi ricchi di zolfo utilizzati per l'estrazione di questo minerale, nei quali, però, la concentrazione algale è elevata solo per quelle zone in cui l'umidità si conserva più a lungo (conche, fenditure delle rocce).

1.2 LE ALGHE DI AMBIENTI ESTREMI

La maggior parte degli organismi estremofili è rappresentata dai procarioti e solo pochi organismi eucarioti possono sopportare condizioni ambientali estreme. In queste condizioni, le alghe vivono ai limiti del loro potenziale fisiologico adattando i propri processi vitali alle condizioni estreme (Elster 1999). Sono due i gruppi di organismi fotosintetici capaci di adattare il loro metabolismo a condizioni estreme di crescita: le alghe acidotolleranti (delle quali ben poche sono le informazioni ecofisiologiche e tassonomiche a disposizione) e le alghe acidofile.

Le alghe acidotolleranti sono in grado di adattarsi ad ampi intervalli di pH (pH 2-8), pur possedendo un optimum di pH intorno alla neutralità; a queste appartengono alghe della divisione delle Heterokontophyta, tra le quali *Pinnularia*, una diatomea tipica dei suoli acidi adiacenti le sorgenti sulfuree e le miniere di zolfo (Pinto & Taddei, 1977) e *Ochromonas vulcanica*, una Chrysophyceae isolata per la prima volta da Gromov (1999) in una solfatara russa e rinvenuta anche nel vallone di Ansanto (AV) (Albertano et al., 1994). Molte sono anche le alghe verdi acidotolleranti: *Chlamydomonas*, molto comune negli ambienti sulfurei italiani (Pinto & Taddei, 1977), *Chlorella saccharophila* var. *saccharophila* (Chlorococcales), in grado di vivere a pH mediamente acidi (pH 3.0) a differenza di *Chlorella saccharophila* var. *ellipsoidea* e *Chlorella protothecoides* var. *acidicola* che invece prediligono ambienti fortemente acidi (Pinto e Taddei, 1984), la nuova specie *Viridiella fridericiana* (Albertano et al., 1991a, 1991b), *Pseudococcomyxa simplex* (Albertano et al., 1990) e *Stichococcus bacillaris* tra le Ulotrichales.

Le alghe acidofile in senso stretto, invece, hanno un optimum di crescita a valori di pH < 3. Ad oggi sono noti solo quattro generi di alghe acidofile: *Dunaliella*, cui appartiene l'unica specie *Dunaliella acidophila* (Kalina) Masyuk (Volvocales, Chlorophyta) precedentemente classificata come *Spermatozopsis acidophila* (Albertano et al., 1981; Fuggi et al., 1988a, 1988b). Gli altri tre generi di alghe acidofile sono tre alghe rosse attualmente ascritte all'ordine delle Cyanidiales, classe delle Cyanidiophyceae (Yoon et al., 2006), in grado non solo di vivere a pH inferiori a 2.0, ma anche a valori di temperatura intorno ai 50°C e per questo sono definite "termoacidofile"; esse sono *Cyanidium*, comprendente una specie termofila, *Cyanidium caldarium* (Tilden) Geitler (Geitler & Ruttner, 1935) e un gruppo di isolati mesofili, ancora identificati come *Cyanidium* sp.; *Galdieria* cui appartengono quattro specie: *Galdieria sulphuraria* (Galdieri) Merola (Merola et al., 1981), *Galdieria partita*, *Galdieria daedala* e *Galdieria maxima* (Sentsova OY, 1991); *Cyanidioschyzon*, con l'unica specie *Cyanidioschyzon merolae* (De Luca et al., 1978).

1.3 CYANIDIOPHYCEAE (RHODOPHYTA)

Le *Cyanidiophyceae* sono un gruppo di alghe rosse asessuate unicellulari di notevole importanza, che vivono in condizioni di elevata acidità (pH 0.5-3.0) e di elevata temperatura (50°C-55°C) (Pinto et al. 2003). Hanno una morfologia relativamente semplice che consiste in cellule sferiche o clavate, con o senza parete. Le cellule contengono un cloroplasto, da uno a tre mitocondri, un nucleo e un vacuolo (Merola et al. 1981; Sentsova 1991; Ott e Seckbach 1994; Albertano et al. 2000; Pinto et al. 2003).

Tre generi (*Cyanidium*, *Cyanidioschyzon* e *Galdieria*) e sei specie sono generalmente riconosciute in questo ordine sulla base di pochi caratteri morfologici, quali forma della cellula, numero e forma dei plastidi, presenza/assenza della parete cellulare, presenza/assenza di vacuoli, modalità di divisione e numero di autospore. Ad ogni modo, la delimitazione del concetto di specie in questo gruppo di alghe unicellulari resta ancora poco chiaro, a causa della scarsità di caratteri realmente diacritici per ciascun taxon (Albertano et al., 2000; Merola et al., 1981, Sentsova, 1991; Ott & Seckbach, 1994; Pinto et al., 2003).

Il genere *Cyanidium* è composto da una sola specie, *Cyanidium caldarium* (De Luca et al., 1978) e le alghe appartenenti a questo genere sono caratterizzate da una morfologia cellulare semplice: sono sferiche, prive di vacuolo e con un solo mitocondrio. Le loro dimensioni sono comprese tra 2 e 6 µm, (De Luca et al., 1972; De Luca e Taddei, 1970), si riproducono vegetativamente attraverso la formazione di 4 endospore ed il cloroplasto contiene clorofilla a, C-ficocianina, alloficocianina e carotenoidi (Allen, 1959). *Cyanidium caldarium* è un organismo autotrofo obbligato capace di crescere sia su ammonio che su nitrato e predilige, come le altre specie, condizioni di acidità estreme (pH 0.0-5.0; optimum pH 1.5) ed una temperatura fino a 55-57°C. (Doemel e Brock, 1971).

Cyanidioschyzon merolae è l'unica specie appartenente al genere *Cyanidioschyzon* (De Luca et al., 1978); le cellule di questa specie hanno dimensioni minori (1,4x3-4 µm) e sono di forma clavata, hanno un unico mitocondrio ed un unico plastidio, possiedono gli stessi pigmenti fotosintetici identificati in *Cyanidium*, ovvero la clorofilla-a e la C-ficocianina, ma differiscono dagli altri generi per la mancanza di parete cellulare e per il tipo di riproduzione vegetativa, che avviene per scissione binaria. Il genoma molto semplice di *Cyanidioschyzon merolae* lo rende un organismo ideale per lo studio dell'origine, della composizione e dei meccanismi fondamentali delle cellule eucariotiche (Kuroiwa et al., 1998; Matsuzaki et al., 2004).

Al genere *Galdieria* appartengono alghe eterotrofe facoltative, capaci di utilizzare sia ammonio che nitrato come fonte di azoto (De Luca, Musacchio e Taddei, 1972); esse

presentano uno o più vacuoli, un mitocondrio e un plastidio multilobati. Al genere sono ascritte quattro specie: la più antica *G. sulphuraria* (Merola et al., 1981) e *G. partita*, *G. daedala*, *G. maxima* (Sentsova et al. 1991) distinte sulla base di caratteri morfologici, quali dimensioni cellulari, numero di endospore, numero e forma dei plastidi nelle diverse fasi del ciclo biologico. Di recente istituzione è *Galdieria phlegrea*, morfologicamente simile alle altre specie appartenenti a questo genere, ma diversa da un punto di vista molecolare. Essa sembra essere un endemismo italiano in quanto è stata ritrovata solo nel sito acido-termale del Pisciarelli, Napoli (Pinto et al. 2006).

Analizzando e comparando i genomi completi di *Cyanidioschyzon merolae* e di *Galdieria sulphuraria* è stato ipotizzato un ordine evolutivo all'interno delle *Cyanidiophyceae* (Yoon et al., 2002). Entrambe le specie posseggono i geni che codificano per diverse varietà di zuccheri-chinasi, ma solo *G. sulphuraria* ha un maggior numero di trasportatori per i monosaccaridi. Ciò può spiegare per *C. merolae* è un organismo foto autotrofo, mentre *G. sulphuraria* ha la capacità di crescere su numerose fonti di carbonio. La stessa comparazione genomica ha anche stabilito che *C. merolae* non ha geni che codificano per enzimi coinvolti nella sintesi, modificazione e degradazione della parete cellulare. Gli autori hanno suggerito che l'architettura della parete cellulare di *G. sulphuraria* le permette di vivere anche dove c'è una bassa umidità (es. nelle spaccature delle rocce), mentre *C. merolae* è confinato in microambienti acquatici o umidi, osmoticamente stabili, e per questo non necessita di parete cellulare. Queste diverse strutture cellulari suggeriscono che le *Cyanidiophyceae* possano essersi evolute da un progenitore comune fornito di una parete cellulare e di capacità eterotrofiche come *G. sulphuraria*. L'organismo che poi avrebbe dato origine alla linea evolutiva di *C. merolae* potrebbe aver colonizzato habitat osmoticamente stabili perdendo quindi nel tempo la capacità di sintetizzare una parete cellulare ed usare come fonte di carbonio direttamente molecole organiche.

1.3.1 ASPETTI FILOGENETICI DELLE CYANIDIOPHYCEAE

Nel 2002 Yoon et al. analizza il genoma di diversi taxa microalgali e, attraverso la costruzione di un albero “minimum evolution” sulla base delle sequenze dei geni 16S rRNA, psaA, psbA, rbcL e tufA afferma che le *Cyanidiophyceae* formano un gruppo monofiletico distante dalle altre alghe rosse (Yoon et al., 2002; Fig.1)

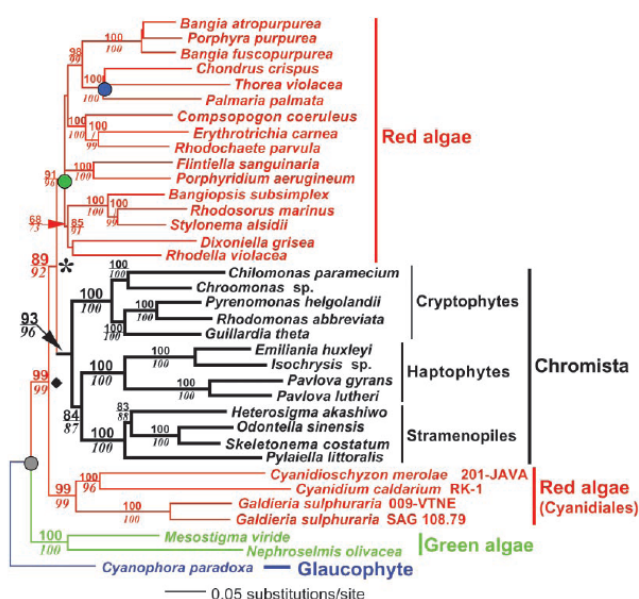


Fig. 1 Relazioni filogenetiche delle alghe rosse con i cromisti (Yoon et al., 2002)

Un recente studio filogenetico condotto attraverso l’analisi di un data set di geni plastidiali housekeeping (rbcL, psaA e psbA) ha permesso di ricostruire meglio la storia evolutiva di queste microalghe, mettendone in luce un’elevata biodiversità (Fig.2). Di fatto il numero di specie morfologiche non combacia con la diversità osservata a livello molecolare: la forma cellulare molto semplice maschera un’estesa diversità biochimica, fisiologica e genetica. L’analisi ha permesso di individuare quattro linee evolutive all’interno delle *Cyanidiophyceae* e cinque nuovi generi/specie: 1) il clade di *Cyanidium caldarium*, fortemente supportato, che include ceppi ubiquitari (Indonesia, Italia e Giappone) e con un basso livello di diversità molecolare intraspecifica, suggerendo quindi un effettivo meccanismo di dispersione; 2) il clade che raggruppa le specie di *Cyanidioschyzon merolae* e *Galdieria maxima*, nonostante esse siano completamente differenti da un punto di vista morfologico: *Cyanidioschyzon merolae* si distingue dalle altre *Cyanidiophyceae* perché ha una forma clavata, si divide per scissione binaria ed è privo di parete cellulare e di vacuoli; le cellule di *Galdieria maxima*, invece, sono di maggiori dimensioni (10-15µm) e

presentano le tipiche caratteristiche delle *Cyanidiophyceae* (forma circolare, presenza di parete cellulare, capacità di vivere eterotroficamente e divisione cellulare mediante la formazione di sporangi); 3) il clade altamente conservato del *Cyanidium* mesofilo e strettamente imparentato con la linea estremofila di *Cyanidium*. Questi ceppi, a differenza delle altre *Cyanidiophyceae*, prediligendo habitat non acidi (pH 7.0-7.2) e non termali (20-25°C) vivono sul del fondo e sulle pareti riparate di cave (Cile, Cuma (It); 4) il clade comprendente il genere di *Galdieria*, che a sua volta si suddivide in due subcladi: 4a) il subclade di *Galdieria*-A, le cui specie presentano una trascurabile diversità morfologica e un chiaro modello di distribuzione geografica: ceppi di diverse aree geografiche (Italia, Messico, USA, Russia ed Indonesia) formano distinti cladi monofiletici all'interno del subclade probabilmente per la loro incapacità di resistere a condizioni di disseccamento e quindi a migrare su lunga distanza; fanno parte di questo gruppo ceppi di *G. sulphuraria* e le due specie russe *G. daedala* e *G. partita*; 5) il subclade di *Galdieria*-B, in seguito chiamata *G. phlegrea* (Ciniglia et al, 2004; Toplin et al, 2008) perché sembri sia essere un endemismo della zona dei campi flegrei (Napoli, Italia), con specie che vivono all'interno delle rocce dove c'è un'umidità relativa moderata. Una delle caratteristiche notevoli dell'attuale filogenesi delle *Cyanidiophyceae* è che i rami interni che portano alle differenti linee evolutive sono sempre molto lunghi, mentre i rami terminali sono sempre molto corti. Questo probabilmente significa che la diversità genetica è frequentemente persa all'interno di una linea evolutiva. Una possibile spiegazione è che le popolazioni di *Cyanidiophyceae*, sviluppandosi in aree vulcaniche, sono costantemente distrutte dalle eruzioni vulcaniche. Solo una o poche popolazioni sarebbero sopravvissute, con il risultato di una bassa diversità genetica all'interno della linea evolutiva. Un'altra spiegazione potrebbe essere che tali alghe seguono un meccanismo di dispersione *step-stone*, ovvero, una o poche cellule di *Cyanidiophyceae* colonizzano un nuovo sito, abbandonando il sito originale, dando vita ad una nuova popolazione con un grado di diversità genetica inferiore al sito di provenienza. Un'ulteriore dispersione da questa nuova area produrrà di nuovo un abbassamento della diversità genetica.

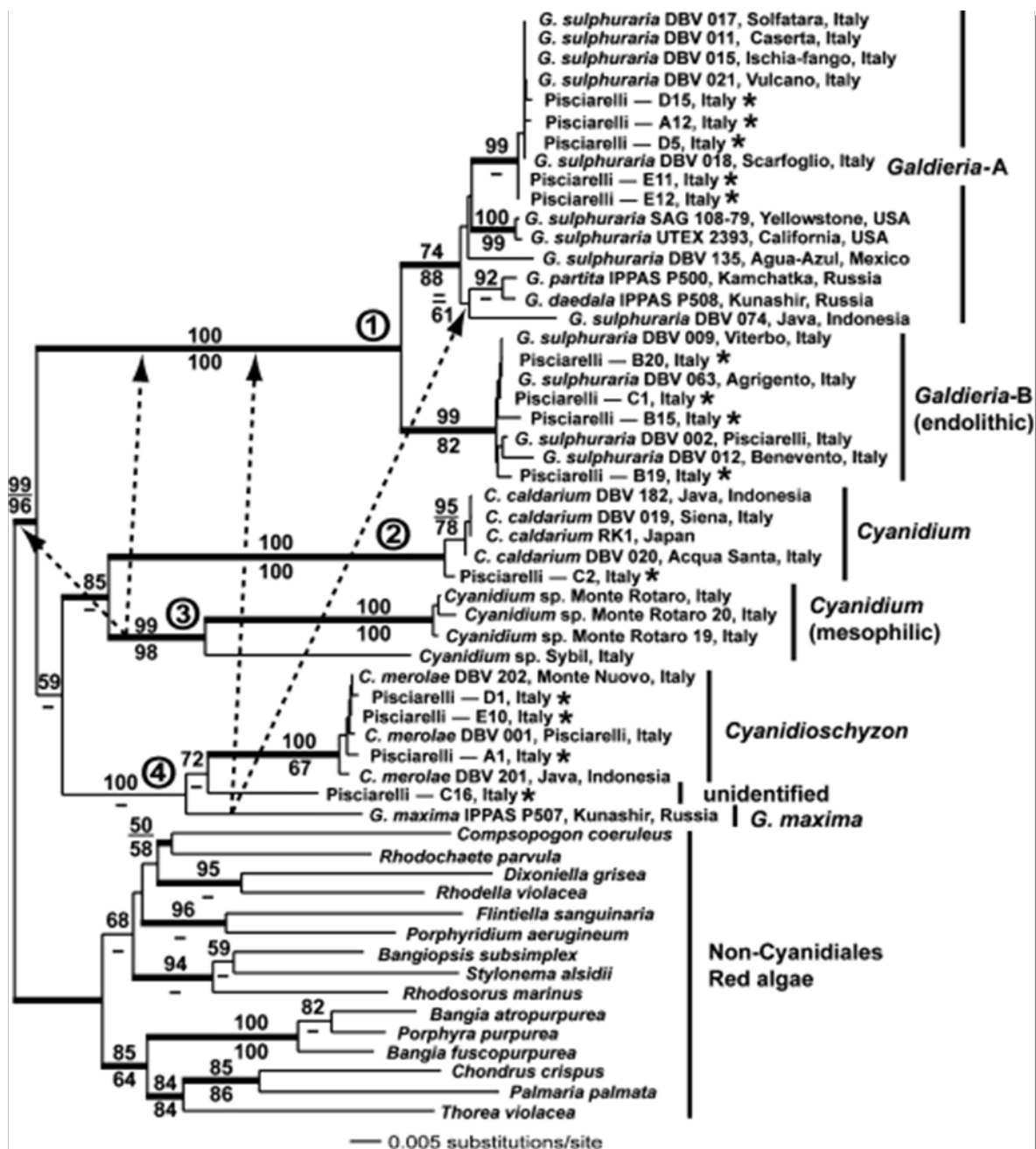


Fig. 2 Albero filogenetico delle Cyanidiophyceae ottenuto mediante l'analisi del gene plastidiale rbcL, con il metodo Minimum evolution (ME). (Ciniglia et al., 2004).

1.3.2 BIOGEOGRAFIA DELLE CYANIDIOPHYCEAE

Nonostante le microalghe occupino una posizione dominante negli ecosistemi, resta ancora vago il numero delle specie presenti e la stima della diversità, complicata da problemi metodologici oltre che concettuali. In tale contesto si colloca la biogeografia come scienza che studia i pattern di distribuzione delle specie nel tempo e nello spazio e i modelli di dispersione che esse seguono, conoscenze essenziali per comprendere la diversità, l'evoluzione ed il ruolo ecologico delle specie (Hedlund & Staley, 2004). L'origine, la

diversificazione e il modello di dispersione delle *Cyanidiophyceae* rappresentano interrogativi importanti, anche se esistono ipotesi al riguardo. La formazione del supercontinente Rodinia, risalente a circa 1,2 miliardi di anni fa, determinò un incremento dei fenomeni vulcanici sulla superficie terrestre. Le *Cyanidiophyceae* si diversificarono dalle linee evolutive delle altre alghe rosse approssimativamente in questo periodo (Yoon et al., 2004), quando il vulcanismo era più diffuso ed esse potevano disperdersi più facilmente nel supercontinente. Allorquando la Rodinia cominciò a dividersi in otto continenti più piccoli, circa 800 milioni di anni fa, le diverse popolazioni di *Cyanidiophyceae* rimasero isolate geograficamente e si differenziarono in linee evolutive diverse per effetto della deriva genetica. Tale divergenza, insieme con la distribuzione geografica, è stata già documentata per i membri del genere *Galdieria* (Ciniglia et al. 2004; Gross et al. 2001); le popolazioni di *Galdieria* infatti, sono disperse in tutto il continente sebbene limitatamente agli habitat acido-termali. Nonostante abbiano una distribuzione “*worldwide-but-discontinuous*”, la dispersione su lunga distanza rappresenta un problema per questi organismi, dal momento che essi non sembrano essere in grado di tollerare condizioni ecologiche “diverse” (Brock 1978; Gross 1999). Pertanto, l’endemismo delle *Cyanidiophyceae* rappresenta una sfida interessante per la teoria della dispersione neutrale (Finlay et al. 2002). Finlay ha proposto che cellule più piccole di 10 µm, spore e cisti sono facilmente trasportate dal vento, uccelli, e altri vettori permettendo loro di avere una distribuzione ubiquitaria: diatomee e cianobatteri per esempio possono disperdersi per via aerea grazie alla loro capacità di formare mucillagini o silice che li protegge dal disseccamento; questo “modello ubiquitario” è riassunto dalla prima parte della teoria di Baas-Becking “Alles is overal, maar het milieu selecteert” (everything is everywhere, but the environment select) (1934). Secondo questo principio, comunemente citato nella biogeografia microbica (Baas-Becking, 1934), i microrganismi possono essere trovati ovunque l’habitat si presenti idoneo per la loro sopravvivenza e non ci sono quindi barriere geografiche che ne limitano la dispersione. Alcuni studiosi, di contro, confutano la teoria della dispersione neutrale poiché è altamente improbabile che tutti i microrganismi siano onnipresenti e supportano, invece, l’idea che l’enorme biodiversità microbica sia una conseguenza di fenomeni di speciazione per la presenza di barriere geografiche che impediscono loro di disperdersi facilmente (Foissner, 2006). Da un lato non possiamo rifiutare nessuno dei due modelli, dall’altro entrambi non possono essere adottati con soddisfazione per spiegare la dispersione di tutti i microrganismi. Secondo Caron (2009) il

problema, che attualmente sembra irrisolvibile, è conseguenza di quattro punti fondamentali strettamente correlati tra loro:

1. L'estesa diversità delle specie che ricadono nel termine "Protisti";
2. L'uso di diversi concetti di specie per descrivere i protisti;
3. L'inadeguatezza degli approcci, ovvero delle tecniche e delle tecnologie a disposizione per studiare la biodiversità microbica negli ecosistemi naturali;
4. La mancanza d'informazione riguardo le relazioni tra i tassi di dispersione, i tassi evolutivi e le modalità di speciazione dei protisti.

2. SCOPO DEL LAVORO

Le *Cyanidiophyceae* sono uno dei gruppi algali più antico, formatosi circa 1,370 milioni di anni fa. Data la loro lunga storia evolutiva, risulta interessante che solo un piccolo numero di specie riconosciute morfologicamente sono sopravvissute in questa linea evolutiva. Tre sono le possibili spiegazioni per questo tipo di osservazione:

1. Le *Cyanidiophyceae* sono sempre state un gruppo microalgale povero in specie;
2. Molte linee evolutive di *Cyanidiophyceae* si sono separate nel tempo, ma solo poche sono sopravvissute a eventi di estinzione ricorrenti (non esistono però reperti fossili a supporto di questo tipo di ipotesi);
3. Le analisi morfologiche e ultrastrutturali non bastano per scoprire e descrivere nuovi taxa di *Cyanidiophyceae* ed è plausibile, quindi, che ne stiamo sottostimando la diversità genetica.

Alla luce dei risultati precedenti, uno studio approfondito della struttura di popolazioni provenienti da diversi siti acido-termali disperse sulla superficie terrestre, sarebbe auspicabile per comprendere meglio l'origine della diversificazione e per ipotizzare modelli di dispersione adatti a queste particolari alghe rosse termo-acidofile.

Nel presente lavoro di dottorato ci si è posti l'obiettivo di studiare su scala globale la biodiversità e la biologia delle popolazioni delle *Cyanidiophyceae*, utilizzando un approccio molecolare, allo scopo di ottenere una revisione tassonomica definitiva del gruppo e informazioni fondamentali circa la loro biologia ed evoluzione. A tal proposito, una cospicua raccolta di popolazioni miste di *Cyanidiophyceae* è stata condotta presso diverse siti idrotermali dell'Islanda e della Turchia e il mio lavoro è stato quello di studiarne la biodiversità, l'origine e la diversità genetica su scala globale utilizzando le nuove sequenze ottenute dai campionamenti in Islanda e in Turchia e aggiungendo nelle analisi tutti gli strain provenienti da diversi siti acido-termali mondiali di cui la sequenza è stata già pubblicata in GenBank. Gli obiettivi principali del presente lavoro di tesi sono i seguenti:

1. Studiare la biodiversità e la biogeografia globale delle *Cyanidiophyceae*.

L'utilizzo di un approccio molecolare rappresenta un valido strumento per valutare la biodiversità e la biogeografia delle *Cyanidiophyceae* da un punto di vista globale. Negli anni diversi campionamenti di *Cyanidiophyceae* sono stati condotti in siti acido-termali mondiali (Islanda, Italia, USA, Nuova Zelanda, Giappone e Turchia) e approcci molecolari sono stati adottati con successo per valutare la biodiversità di questo gruppo (Ciniglia et al.,

2004; Yoon et al., 2006a; Ciniglia et al., 2014). Ricostruire una robusta filogenesi utilizzando le sequenze che codificano per la subunità maggiore della RubisCO (*rbcL*) di tutte le *Cyanidiophyceae* dei siti acido-termali mondiali esplorati, permetterà di valutarne la biodiversità globale nonché la struttura biogeografica delle popolazioni.

2. Definire il livello di diversità genetica e risolvere le linee evolutive nell'ambito del genere *Galdieria*

Sulla base delle analisi filogenetiche condotte in questo studio, il presente lavoro di tesi si propone di valutare il grado di diversità genetica nell'ambito del genere *Galdieria* e individuare il numero di linee evolutive realmente presenti nell'ambito di questo genere sulla base dell'ampia disponibilità di sequenze nucleotidiche per il gene *rbcL* e mediante la costruzione di network di aplotipi. In uno step successivo sarà eseguita una nested clade analyses che consente di studiare la distribuzione spaziale della variabilità genetica. Tale tipo di analisi è più risolutiva per rivelare le associazioni geografiche rispetto alle tradizionali tecniche e consente di discriminare tra le associazioni filogeografiche dovute a flusso genico e gli eventi storici che operano a livello popolazionale (eventi di colonizzazione, di frammentazione della popolazione o di espansione).

3. MATERIALI E METODI

3.1 DESCRIZIONE DEI NUOVI SITI DI CAMPIONAMENTO

3.1.1 ISLANDA: CARATTERISTICHE GEOGRAFICHE E GEOLOGICHE

La scelta dell'Islanda come sito di studio per comprendere la biodiversità delle *Cyanidiophyceae* ricade su alcune caratteristiche tipiche di quest'isola. Essa è la terza isola più grande dell'Oceano Atlantico, con un'area di 103,106 km², e un'altitudine media di 500 m. Essa si trova quasi interamente a sud del Circolo Polare Artico, nella giuntura tra l'oceano Nord Atlantico e quello Artico; nonostante il suo clima sia influenzato dalla Corrente del Golfo proveniente dal Messico, la combinazione dell'alta latitudine e delle abbondanti precipitazioni fa sì che circa il 10% del paese sia coperto da ghiacciai. L'Islanda è un'isola relativamente giovane: essa si è originata appena 16 miliardi di anni fa in seguito all'intensa attività vulcanica, conseguenza della Dorsale Medio-Atlantica che attraversa l'isola da sud-ovest a nord-est. Il vulcanismo islandese si confina in zone ristrette, che sono l'espressione subaerea della Dorsale e ricoprono circa 1/3 dell'intera isola (Geirsdottir et al., 2007); si contano circa 35 sistemi vulcanici, tutti localizzati vicino la giunzione tra la zona vulcanica orientale e la zona vulcanica settentrionale (Sturkell et al., 2006). L'intensa attività vulcanica sotterranea genera estese aree idrotermali caratterizzate da geyser, laghi caldi, fango bollente e solfatare, tutti habitat ottimali per lo sviluppo della microflora termoacidofila. L'isolamento geografico, insieme con la sua giovane età e con l'origine molto antica delle *Cyanidiophyceae* fa di questo un modello utile per studiare la biodiversità e per comprendere come si disperdono e poi come si distribuiscono i microrganismi estremofili.

3.1.2 DESCRIZIONE DEI SITI DI CAMPIONAMENTO ISLANDESI

Allo scopo di valutare la biodiversità delle *Cyanidiophyceae* all'interno di una stessa area geotermale e tra aree diverse, un campionamento puntiforme è stato condotto in cinque stazioni geotermali dell'Islanda: Gunnhver (SWI.GU), Nesjavellir (SWI.NE), Seltun (SWI.SE), Landmannalaugar (SEI.LA) e Viti (NEI.VI) (Fig.3);

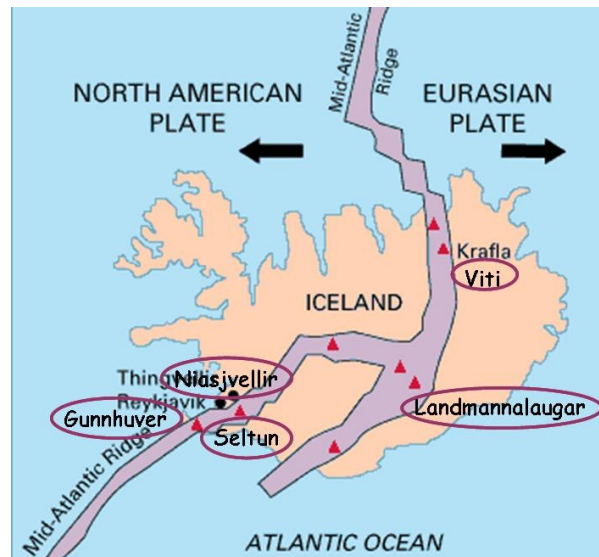


Fig.3 Mappa dell'Islanda con il particolare della Dorsale Medio-Atlantica che attraversa l'isola ed i siti di campionamento

Gunnhver è una stretta area geotermale localizzata nella zona sud-ovest dell'isola vicino alla città di Grindavik e fa parte del sistema vulcanico Reykjanes. Oggigiorno chi visita questa area geotermale può solo vedere fumarole e pozze di fango bollente, anche se in passato era possibile assistere a potenti geysir, di fatto la zona è sottoposta all'azione di continui terremoti di bassa magnitudo, alcuni dei quali negli anni hanno causato uno slittamento della crosta terrestre creando delle fessure attraverso le quali l'acqua poteva fuoriuscire sotto forma di geysir. Altra caratteristica di Gunnhver è la presenza di pozze di fango bollente, tra cui spicca quella più grande dell'intera isola, che ha un diametro di 20 m ed è accerchiata da un bordo di fango che bolle vigorosamente. Nesjavellir è localizzata su una spaccatura della North Atlantic Rift ed è l'area con la più alta temperatura dell'Islanda; l'acqua piovana si infila nella profondità del suolo attraverso le faglie sotterranee e durante il suo percorso viene riscaldata dalle rocce calde, raggiungendo anche temperature di 300°C e riemerge in superficie sotto forma di acqua bollente e vapore. L'attività geotermica è strettamente connessa a tre sistemi vulcanici della regione: il sistema vulcanico Grenjadalur nella zona meridionale dell'area, quello di Hromundartindur nella zona settentrionale, inattivo da circa 10000 anni, e quello di Hengill nella zona occidentale. Krisuvik è un'area geotermale situata nella penisola del sistema vulcanico Reykjanes in corrispondenza di una fessura della Dorsale Medio-Atlantica. Essa è un'ampia area costituita da diverse zone geotermali, tra le quali quella di Seltun, caratterizzata da solfatare, fumarole, fango bollente e sorgenti termali; l'azione acida dell'acqua e dei gas conferisce a queste terre colori che vanno dal verde al giallo e al rosso, in seguito alla deposizione di solfuri, nonché di solfati

bianco-giallastri. Caratteristica della zona è la presenza di diversi laghetti vulcanici che si formano per esplosioni causate dal vapore bollente proveniente dalle profondità della terra ed ancora oggi è possibile assistere alla formazione di un nuovo laghetto con un'esplosione spettacolare. Nella zona Sud-Est dell'Islanda i campioni sono stati raccolti alla stazione geotermale di Landmannalaugar, vicino il vulcano Hekla, uno dei vulcani più attivi dell'isola; il termine "Landmannalaugar" si riferisce alle sorgenti naturali calde (36-40°C) nelle quali le persone possono fare il bagno durante tutto l'anno, anche nel mezzo di un inverno rigido e nevoso, alle pendici di montagne che nel tempo hanno assunto diverse colorazioni (rosa, verde, giallo, marrone, viola, bianco e nero) per la presenza di strati di lava diffusa. Nella regione Nord Est dell'Islanda è presente una caldera di circa 10 km, nominata Krafla, e Viti è uno dei crateri caratterizzato da un lago al suo interno; l'attività geotermica di quest'area riguarda solamente fumarole di vapore e piscine di fango bollente.

3.2.1 TURCHIA: VULCANISMO E STORIA GEOLOGICA

La Turchia è una penisola che funge da ponte di 1600 Km tra l'Europa e l'Asia. Il paese si estende per un totale di 783,562 km², di cui il 97% occupa la parte anatolica, conosciuta anche come Turchia asiatica, mentre la restante parte si trova in territorio Europeo ed ospita più del 10% dell'intera popolazione turca; le due parti sono separate dallo stretto del Bosforo che collega il Mar Nero con il Mar Egeo. Da un punto di vista geologico, il territorio turco è localizzato tra due mega continenti: la Gondwana a sud e la Laurasia a nord. Si assume di fatto che esso sia il risultato della separazione di frammenti che si sono staccati dai mega continenti per unirsi insieme a formare la penisola turca (Göncüoğlu et al, 1997). La zona sud orientale della Turchia fa parte della placca arabica e si separa dalle zona appena a nord per la presenza di una catena rocciosa, nota come "Zagros Fold and Thrust Belt" che si estende verso sud ed è il risultato del movimento della placca arabica (circa 3 cm ogni anno) verso la placca euroasiatica. La zona è contraddistinta per depositi di lava andesitica e riolitica, alternati a rocce sedimentarie clastiche e nere derivanti dalla solidificazione di fango mischiato con acqua. In corrispondenza del confine settentrionale della placca arabica c'è la zona di Bitlis caratterizzata da un grande numero di rocce metamorfiche e sedimentarie. Proseguendo verso Nord, c'è l'Anatolia orientale, caratterizzata da abbondanti precipitazioni e un clima più rigido, in quanto l'altitudine è più elevata in questa regione. All'estrema punta orientale della regione si erge il Monte Ararat che è il punto più alto della Turchia con i suoi 5,137 metri. La maggior parte dei monti di questa regione sono di origine vulcanica (Nemrut, Tendurek, Ararat) e i territori che si

estendono alle loro pendici sono caratterizzati da estensioni di lava che ricoprono il territorio per decine di chilometri. Nonostante la Turchia, formatasi in seguito all'attività dei mega continenti, Gondwana e Laurasia, sia una terra ancora geologicamente attiva perché soggetta a continui terremoti, conseguenza dello spostamento della placca araba verso quella euroasiatica, non registra nel corso degli anni un'intensa attività vulcanica; sono solo tre i grandi vulcani attivi riconosciuti fino ad adesso, l'Ararat, il monte Nemrut e il monte Tendurek dei quali non si ricordano più eruzioni dal diciannovesimo secolo. Zone di vulcanismo secondario, sede di importanti bagni termali, però, sono dislocate in tutto il paese e sono tutti ambienti ideali per lo sviluppo di microrganismi estremofili e riguardano sia la zona Sud orientale, sia quella Nord orientale nei pressi dei vulcani sopra citati, sia la zona Sud occidentale (Fig. 4).



Fig. 4 Mappa della turchia

3.2.2 DESCRIZIONE DEI SITI DI CAMPIONAMENTO TURCHI

Il campionamento condotto nelle terre turche ha riguardato nove stazioni geotermali dislocate nelle regioni sud orientale, nord orientale e del sud occidentale della penisola: Diyarbakir-Cermik (SET-CE), Siirt-Biloris (SET-BI), Guclukonak-Hesta (SET-GU), vulcano Nemrut (CET-NE), vulcano Tendürek (CET-TE), Agri-Diyadin (NET-DI), Manisa-Kula (SWT-KU), Manisa-Salihli e Kursunlu (SWT.SL), Manisa-Sart (SWT-SR) e Aydin-Germencik (SWT-GE). Cermik, conosciuta anche come Aberna, è una città appartenente alla Provincia di Diyarbakir il cui nome deriva da una famosa spa a livello mondiale. L'acqua di questa spa contiene cloruro di sodio e solfati di calcio utili per combattere reumatismi, problemi digestivi, malattie della tiroide e dei reni, nonché disfunzioni metaboliche. Il campionamento è stato effettuato lungo un muro all'ingresso dell'Hamam e all'interno delle diverse piscine dell'area termale. Nella zona di Siirt ci sono importanti

centri termali tra cui Saglarca, Hesta e Biloris. Quest'ultima si trova 17 km a sud di Siirt, a sud ovest del lago Van ed è caratterizzata dalla presenza di zolfo, bicarbonato, sodio, idrogeno solforato e calcio. Gli abitanti del posto si recano presso questo centro termale per combattere reumatismi, affaticamento mentale e muscolare, problemi della pelle, ginecologici e respiratori. La spa presenta un unico grande ambiente sui cui muri è stato possibile raccogliere campioni microalgali, nonché due cave all'ingresso caratterizzate da un ambiente umido a tal punto da permettere la fioritura delle *Cyanidiophyceae*. Güçlükönak (Hesta) è un centro termale ancora in costruzione a sud della Turchia orientale quasi al confine con la Siria e l'Iraq. Il sito geotermale vero e proprio riguarda una piccola grotta naturale nella roccia con un unico ingresso dove ci sono forti emissioni di H_2S e la temperatura raggiunge i $60^{\circ}C$. Lungo tutti i muri è stato possibile raccogliere campioni di *Cyanidiophyceae* in grande abbondanza essendo queste le condizioni di crescita ideale di queste microalghe. La montagna del Vulcano Nemrut, ormai inattivo da molti anni, sorge subito ad Ovest del lago Van. Lungo le pareti all'interno del cratere ci sono detriti piroclastici, strati di lava ossidiana e accumuli di lava viscosa solidificati. All'interno del cratere è presente un lago freddo ed un caldo di origine vulcanica. In alcuni punti del cratere è ancora visibile una minima attività geotermica caratterizzata da emissioni di vapore acqueo e di H_2S . Il campionamento è stato fatto in cima ad una piccola collinetta dove c'è un'apertura da cui fuoriescono i gas e lungo il lago caldo dove era visibile l'acqua che ribolliva. Il vulcano Tendurek Dagi si trova a nord del monte Nemrut e 50 km a sud ovest del monte Ararat. La nascita di questo vulcano è avvenuta in seguito a piccole eruzioni, seguite da un'eruzione centrale e al collasso della caldera; l'ultima eruzione esplosiva si registra nel 1855. Strati di lava fuoriuscita dalla parte occidentale del cratere hanno ricoperto un'area di $500m^2$ estendendosi per 10-20 km a nord e a sud del cratere. In seguito all'attività dell'uomo, le emissioni geotermali si sono ridotte ad una sola e il campionamento è stato effettuato in questi pochi punti vicino alle emissioni gassose. A Diyadin sorge una zona geotermale dove è possibile curarsi per problemi respiratori, reumatismi, malattie della pelle e ginecologiche. L'area si estende in più punti termali con caratteristiche fisiche e chimiche simili. Il primo punto di campionamento era costituito da un laghetto di acqua termale dalla quale fuoriuscivano emissioni gassose e il materiale è stato raccolto in diversi punti al di sotto e al di sopra del substrato bianco sulle sponde di questo laghetto. Il secondo luogo di campionamento è stato nei pressi di una piccola cascata di acqua sulfurea misto a emissioni gassose che sfociava in un piccolo laghetto attorno al quale il substrato bianco nascondeva strati di *Cyanidiophyceae*. Nella zona orientale del

paese esistono diverse zone geologiche che l'uomo ha utilizzato per creare numerosi centri idrotermali. Il primo sito di campionamento visitato è stato Kula della provincia di Manisa: le emissioni sulfuree riguardavano una piccola zona, chiusa dall'uomo, in cui erano ben visibili diversi starti algali sul substrato. Sito successivo sono state le Terme di Kursunlu a Salihli, provincia di Manisa nelle quali il materiale algale è stato raccolto in diversi punti che mostravano uno strato verde sul substrato, anche se tutte le emissioni sulfuree sono state chiuse per creare il centro termale. L'ultimo sito di campionamento ha riguardato una sorgente termale facente parte di una spa a Germencik, provincia di Aydin.

3.2 CAMPIONAMENTO

Per ogni sito, sia per quelli islandesi, sia per quelli turchi, è stato raccolto un numero variabile di campioni, a seconda dell'ampiezza del sito, in microambienti diversi, quali la superficie dei cristalli di solfuro, attorno ai granuli di terreno friabile e tra gli strati di fango (Fig. 5), e per ognuno di essi è stato misurato il pH con un pH-metro portatile (Hanna Instruments, Padova, Italia), insieme con le cartine tornasole, e la temperatura con un termometro digitale (Field Environmental Instruments, Pittsburgh, Pennsylvania, USA); le caratteristiche fisiche dei siti di campionamento sono indicate nelle tabelle.....

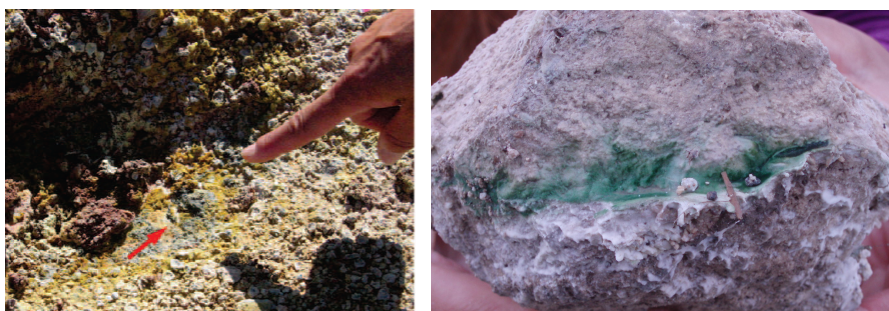


Fig. 5 Particolari di Cyanidiales sui depositi sulfurei

I campioni sono stati raccolti raschiando la superficie del substrato e conservate in tubi di poliestere sterili (Falcon). In laboratorio le alghe sono state fatte crescere in terreno Allen pH 1.5 (Allen&Stainer, 1968) e successivamente isolate mediante diluizioni seriali e piastramento su terreno agarizzato per ottenere colture monoclonali. Le singole colonie sono state risospese nuovamente nel medesimo terreno di coltura e poste alla temperatura di 37°C. Infine tutte le colture monoclonali sono state numerate e conservate nella collezione algale dell'Università Degli Studi Di Napoli "Federico II" (ACUF, www.acuf.net).

3.3 ESTRAZIONE E PCR

Il materiale cellulare è stato omogenato usando biglie di vetro e il Mini-BeadBeater (Biospec, Bartlesville, OK, USA) e l'estrazione del DNA genomico totale è stata fatta usando il DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Santa Clarita, CA, USA). Quattro primer degenerati sono stati utilizzati per amplificare il gene dell'*rbcL* (Tab. 1) e i prodotti di PCR sono stati purificati con il Qiaquick PCR purification Kit (Qiagen, Santa Clarita, CA, USA) e successivamente usati per il sequenziamento usando il BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing Kit (PE-Applied Biosystems, Norwalk, CT, USA). Infine i campioni sono stati sequenziati con il sequenziatore ABI-3100 (Applied Biosystems) presso il Roy Carver Center for Comparative Genomics dell'Università dell'Iowa (USA) per i ceppi islandesi e presso il dipartimenti di biologia strutturale e funzionale per i ceppi turchi.

Geni	Primer interni	Primer esterni	Sequenza
<i>rbcL</i>		090F	5'- CCATATGCYAAAATGGGATATTGG-3'
		RcR	5'- GCWGTGGGTGTYTCHACWAAATC-3'
	Rc475F		5'- AAAACTTTCCAAGGRCCWGC-3'
	Rc910R		5'- TTWCCTGCTCTRTGTAARTG-3'

Tab. 1 Sequenza dei primer usati in questo lavoro

3.4 ANALISI DEI DATI

Le sequenze forward e reverse sono state assemblate ed editate con il programma Chromas Lite v.2.1 (<http://www.technesium.com.au/chromas.html>) e allineate con sequenze complete (Ciniglia et al., 2004; Tolpin et al., 2008; Skorupa et al., 2013) pubblicate in GeneBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) usando il programma UGENE v 1.16.0 (<http://ugene.unipro.ru>). I livelli di polimorfismo all'interno di ogni popolazione distinta geograficamente e all'interno della popolazione totale di ogni filotipo sono stati stimati con la diversità aplotipica (h) e diversità nucleotidica (π), mentre l'espansione della popolazione è stata valutata mediante il test di neutralità Tajima (D) (Tajima 1989) e Fu and Li (F^*) (Fu and Li 1993), implementati nel programma DnaSP v.5.10.01 (Librado & Rozas, 2009). Considerando le popolazioni distinte geograficamente, è stata valutata la possibile correlazione tra una matrice di distanze genetiche e una matrice delle distanze geografiche mediante un'analisi di correlazione di Mantel.

Le analisi di genetica di popolazione sono state condotte stimando la genealogia del gene con lo statistical parsimony network mediante il programma TCS v.1.21 (Clement et al., 2000). Per investigare il contributo relativo di processi evolutivi passati e recenti nel determinare la struttura genetica di una popolazione è stata applicata la procedura NCA, basata sul concetto della coesione di Templeton (2001), il quale definisce una linea evolutiva come una popolazione che si riproduce con una continuità storica sufficiente da avere una sua traiettoria e tendenza evolutiva. Più precisamente la NCA è un metodo molto valido per studiare la filogeografia delle specie e delle popolazioni ed è possibile investigare il contributo relativo di processi evolutivi passati e recenti nel determinare la struttura genetica di una popolazione. Sul network degli aplotipi viene costruito un disegno di cladi annidati in cui gli aplotipi separati da una singola mutazione (“cladi di livello 0”) sono raggruppati in “cladi di primo livello”, quindi i cladi di primo livello separati da una mutazione sono raggruppati in “cladi di secondo livello” e così via, fino a che l’ultimo livello di “nesting” comprende l’intero cladogramma (seguendo le regole fornite in Templeton et al., 1987 e Templeton & Sing, 1993). Quindi i cladi sono testati contro la loro localizzazione geografica con un’analisi di contingenza delle permutazioni (Templeton & Sing, 1993). Per ogni livello di nesting X, vengono calcolate: 1) La distanza media degli individui che si trovano nel clade X dal centro geografico del clade stesso (distanza di clade o Dc); 2) La distanza media degli individui che si trovano nel clade X-1 (clade di livello inferiore rispetto ad X) dal centro geografico del clade X (distanza del clade annidato o Dn); 3) La differenza tra la Dc (e Dn) media dei cladi interior (hanno più di una connessione nel network) e quella dei cladi tip (hanno una sola connessione; distanza tip-interior o I-T). Le misure di distanza calcolate sono state confrontate con una distribuzione di distanze generata con 1000 permutazioni casuali dei cladi rispetto alle località geografiche. Questa procedura permette di verificare l’esistenza di Dc e Dn significativamente piccole o grandi per ogni clade rispetto all’ipotesi nulla di assenza di associazione geografica all’interno di ciascun clade. Prima di effettuare quest’analisi è stata definita la relazione tip-interior al livello dell’intero cladogramma. Castelloe & Templeton (1994) hanno mostrato che i cladi tip sono quasi sempre più recenti dei cladi interior ai quali sono connessi: di conseguenza, la relazione tip-interior può essere interpretata come una relazione discendente-antenato. Inoltre questi autori hanno mostrato che tra gli aplotipi interior, quello che presenta il maggior numero di connessioni all’interno del network è spesso anche il più antico. Quindi, risalendo alle relazioni di discendenza tra gli aplotipi, si può anche definire lo stato tip-interior, nel caso in cui questo non sia evidente dal network (cioè nel caso in cui i cladi

nested abbiano tutti una sola connessione). In particolare, Templeton (2004) suggerisce di considerare interior il clade in cui la somma degli “outgroup weights” (una stima dell’età degli aplotipi; Castelloe & Templeton, 1994) di tutti gli aplotipi interni ad esso sia pari o maggiore del 95%. Per i soli cladi significativi, sono stati inferiti i processi evolutivi coinvolti nel determinare la struttura genetica osservata, seguendo la versione più recente della chiave di inferenza fornita da Templeton (2005).

Un albero Maximum likelihood è stato prodotto con il programma Mega v.6.06 (<http://www.megasoftware.net/megamacBeta.php>), usando come modello di sostituzione GTR, con il modello del tasso di eterogeneità Gamma (G) e con 1000 repliche di bootstrap.

La valutazione della capacità dei ceppi di Cyanidiophyceae è stata valutata seguendo un esperimento di crescita e valutando la misura del pH, la quantità di clorofilla con l’utilizzo del fluorimetro e la concentrazione algale mediante lettura colorimetrica. Per valutare la correlazione tra i dati ottenuti durante l’esperimento dell’abbassamento del pH, è stata applicata l’analisi nota come Principal Component Analysis (PCA). Questa analisi è una moderna analisi multivariata che consente di ridurre una ampia matrice di dati in poche componenti (componenti principali) ortogonali tra di loro che spiegano la maggior parte della variabilità tra i dati e consentono di fornire un modo per identificare differenze o similarità statistiche nei dati di partenza (Chapman et al. 2001). E’ uno tra i metodi maggiormente usati, non richiede alcuna classificazione preliminare dei dati e tende a ridurre la complessità di ampi data set attraverso la riduzione della complessità, limitandosi ad analizzare le principali variabili, per varianza. Le componenti principali estratte con la PCA sono state ruotate ortogonalmente utilizzando il metodo "Varimax" con la normalizzazione di Kaiser (Davis, 2002) e tutte le analisi sono state effettuate con il software SPSS v. 20 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

4. RISULTATI

4.1 FILOGENESI DELL'*RBCL* E BIODIVERSITÀ DELLE *CYANIDIOPHYCEAE* ISLANDESI E TURCHE

In seguito alla procedure di isolamento, sono stati prodotti 143 isolati di origine islandese e 227 di origine turca; di questi 122 ceppi (83 di origine islandese e 39 di origine turca) sono stati impiegati per le analisi filogenetiche. Il numero dei ceppi analizzati ed identificati per ogni sito di campionamento è mostrato nella tabella seguente (tab. 2) insieme con le coordinate geografiche, pH, temperatura e una piccola descrizione per ogni sito di campionamento.

Luogo, Regione (coordinate)	Codice luogo di campionamento	Numero degli isolati (<i>G. sulphuraria</i> / <i>G. maxima</i> / <i>G. phlegrea</i> / <i>C. merolae</i> / <i>C. caldarium</i>)	Codice sito	Caratteristiche ambientali	pH	T
Islanda						
Gunnhuver, Reykyanes Islanda Sudoccidentale (63°49'11"N 22°41'47"E)	SWI.GU	8/0/0/0/0	1.2	Fumarole, suolo acido	0-1	25°C
			1.4	Fango acido	0-1	29°C
Seltun, Krisuvik Islanda Sudoccidentale (63°53'35"N 22°3'45"W)	SWI.SE	26/9/0/0/0	2.2	Suolo acido	0-1	19°C
			2.3	Suolo acido, coperto da cristalli di zolfo	0-1	27°C
			2.5	Lago acido	0-1	27°C
			2.6	Campione endolitico	0-1	19°C
			2.7	Lago acido	0-1	31°C
Niasjvellir, Tingvellir Islanda Sudoccidentale (64°06'29"N 21°15'25"E)	SWI.NE	13/4/0/0/0	4.3	Ruscello acido	0-1	42°C
			4.5	Suolo acido	0-1	31.2°C
			4.7	Ruscello acido	4.5	47°C
Viti, Krafla Islanda Nordorientale (65°52'00"N 16°51'00"W)	NEI.VI	8/0/0/0/0	6.3	Fango acido	1.5	25°C
			6.4	Suolo acido	1	40°C
Landmannalaugar, Hekla, Islanda sudorientale (65°43'03"N 16°45'17"E)	SEI.LA	4/10/0/0/0	8.1	Suolo acido	1	47°C
			8.3	Suolo acido	1	42°C
Turchia						

Cermik, Diyarbakir Turchia Sudorientale (38°8'16"N 39°28'3"E)	SET.CE	0/4/7/0/1	1.1,1.2	Sul muro ricoperte da uno strato bianco di intonaco	7.2	22.4°C
			1.3, 1.4, 1.5	All'interno dell'Hamam	7	26°C
Biloris, Siirt Turchia Sudorientale (37°56'7"N 41°56'12"E)	SET.BI	0/3/3/1/0	3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5	Cave	7	25.8°C
			3.6, 3.7	All'interno dell'Hamam	8.11	26.5°C
			3.8, 3.9, 3.10	Sul primo muro all'ingresso dell'Hamam	8	24.8°C
Güçlükönak, Şirnak Turchia Sudorientale (37°28'10"N 41°54'39"E)	SET.GU	2/2/2/0/0	4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5	In diversi punti del muro all'interno del bagno termale	1	60°C
Nemrut Mountain, Bitlis Turchia Centrorientale (38°37'33"N 42°14'44"E)	CET.NE	0/0/0/1/0	5.1, 5.2, 5.3	Piccolo incavo con emissioni di gas	7	32°C
			5.4	Sulle rocce vicino ad un lago caldo	6.7	46°C
Tendürek Mountain, Çaldıran Turchia Centrorientale (39°14'54"N 44°1'23"E)	CET.TE	0/0/0/1/0	6.1	All'interno del bagno termale	7	35°C
Agri, Diyadin Turchia Nordorientale (39°32'26"N 43°40'57"E)	NET.DI	0/3/2/0/1	7.1, 7.2, 7.3	Vicino ad una polla con emissioni di H2S	6.7	41°C
			7.4	Vicino ad una sorgente termale	7	45°C
			7.5, 7.6, 7.7, 7.8	Sotto strati di substrato friabile	7	45°C
			7.10, 7.11	All'interno di rocce vicino ad un ruscello termale	6.7	46°C
Kula, Manisa Turchia Sudoccidentale (38°32'45"N 28°38'48"E)	SWT.KU	0/1/1/0/0	8.1	Dentro una vasca con acqua calda e sulfurea	7	41°C
			8.2	Sul suolo che circonda la vasca	7	23,6°C
Salihli, Manisa Turchia Sudoccidentale (38°29'19"N 28°7'53"E)	SWT.SL	0/0/0/0/0	8.3	All'interno di un'area termale, vicino ad una sorgente calda	7	27°C

			8.4, 8.5	Strati superficiali di una vasca termale	8	25°C
Sart, Manisa Turchia Sudoccidentale (38°29'19"N 28°7'53"E)	SWT.SR	0/0/0/0/0	8.6	All'interno del substrato vicino la piscina termale	6.9	25°C
Germencik, Aydin Turchia Sudoccidentale (37°52'15"N 27°35'58"E)	SWT.GE	4/1/0/0/0	9.1	Hotel Burç, vicino ad una sorgente termale	7	26°C

Tab. 2 Luoghi di campionamento con relativi codici, numero dei campioni, pH e temperature per tutti i siti di campionamento in Islanda e in Turchia.

Per condurre l'analisi filogenetica, sono stati usati 271 sequenze di *rbcL* della lunghezza di 431 coppie di basi, dei quali 122 nuovi isolati islandesi e turchi, 146 sequenze di *rbcL* pubblicate in GenBank e tre outgroup (tab. 3).

Codice ceppo	Nome ceppo	Sito di campionamento	<i>rbcL</i>
ACUF009	<i>Galdieria phlegrea</i>	Viterbo (Italia)	AY119768
ACUF063	<i>Galdieria phlegrea</i>	Agigento (Italia)	AY119769
SAG 108.79	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Yellowstone (USA)	AY119767
UTEX2393	<i>Galdieria sulphuraria</i>	California (USA)	AF233069
ACUF011	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Caserta (Italia)	AY541303
ACUF135	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Agua-Azul (Messico)	AY541309
ACUF012	<i>Galdieria phlegrea</i>	Benevento (Italia)	AY541310
ACUF074	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Java (Indonesia)	AY541308
ACUF017	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Solfatara (Italia)	AY541306
ACUF018	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Scarfoglio (Italia)	AY541304
ACUF002	<i>Galdieria phlegrea</i>	Pisciarelli (Italia)	AY541311
ACUF021	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Vulcano (Italia)	AY541307
ACUF015	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Ischia (Italia)	AY541305
isolate SP3-C2	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Sasso Pisano (Italia)	DQ916749
isolate SP1-10	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Sasso Pisano (Italia)	DQ916748
isolate MR6-C36	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Monte Rotondo (Italia)	DQ916747
isolate MR5-C17	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Monte Rotondo (Italia)	DQ916746
isolate MR4-21	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Monte Rotondo (Italia)	DQ916745
IPPAS P500	<i>Galdieria partita</i>	Kamchatka (Russia)	AB18008
IPPAS P508	<i>Galdieria daedala</i>	Kunashir (Russia)	AY541302
IPPAS P507	<i>Galdieria maxima</i>	Kunashir (Russia)	AY391370
ACUF201	<i>Cynidioschyzon merolae</i>	Java (Indonesia)	AY119765
ACUF202	<i>Cynidioschyzon merolae</i>	Monte Nuovo (Italia)	AY541296
ACUF001	<i>Cynidioschyzon merolae</i>	Pisciarelli (Italia)	AY119766
RK1	<i>Cyanidium caldarium</i>	Giappone	NC_001840
ACUF019	<i>Cyanidium caldarium</i>	Siena (Italy)	AY541297
ACUF182	<i>Cyanidium caldarium</i>	Java (Indonesia)	AY541298
ACUF 020	<i>Cyanidium caldarium</i>	Acqua Santa (Italia)	AY541299
isolate MR4-22	<i>Cyanidium caldarium</i>	Monte Rotondo (Italia)	DQ916750

isolate MR5-5	<i>Cyanidium caldarium</i>	Monte Rotondo (Italia)	DQ916751
isolate MR6-C35	<i>Cyanidium caldarium</i>	Monte Rotondo (Italia)	DQ916752
isolate SP1-10	<i>Cyanidium caldarium</i>	Sasso Pisano (Italia)	DQ916753
sp.19	<i>Cyanidium cave</i>	Monte Rotaro (Italia)	AY541300
sp.20	<i>Cyanidium cave</i>	Monte Rotaro (Italia)	AY541301
Cavesp.	<i>Cyanidium</i> sp.	Terme di baia (Italia)	KC914876
CloneA1	<i>Cynidioschyzon merolae</i>	Pisciarelli (Italia)	AY541312
CloneA12	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Pisciarelli (Italia)	AY541313
CloneB15	<i>Galdieria phlegrea</i>	Pisciarelli (Italia)	AY541314
CloneB19	<i>Galdieria phlegrea</i>	Pisciarelli (Italia)	AY541315
CloneB20	<i>Galdieria phlegrea</i>	Pisciarelli (Italia)	AY541316
CloneC1	<i>Galdieria phlegrea</i>	Pisciarelli (Italia)	AY541317
CloneC16	Unidentified	Pisciarelli (Italia)	AY541319
CloneD1	<i>Cynidioschyzon merolae</i>	Pisciarelli (Italia)	AY541320
CloneD5	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Pisciarelli (Italia)	AY541321
CloneD15	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Pisciarelli (Italia)	AY541322
CloneE10	<i>Cynidioschyzon merolae</i>	Pisciarelli (Italia)	AY541323
CloneE11	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Pisciarelli (Italia)	AY541324
CloneE12	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Pisciarelli (Italia)	AY541325
CCMEE5710	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Whitel Island (Nuova Zelanda)	EF675183
CCMEE5711	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Whitel Island (Nuova Zelanda)	EF675173
CCMEE5707	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Waiotapu (Nuova Zelanda)	EF675181
CCMEE5719	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Waiotapu (Nuova Zelanda)	EF675175
CCMEE5715	<i>Galdieria maxima</i>	Whaka (Nuova Zelanda)	EF675149
CCMEE5709	<i>Galdieria maxima</i>	Whaka (Nuova Zelanda)	EF675161
CCMEE5708	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Whaka (Nuova Zelanda)	EF675172
CCMEE5718	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Whaka (Nuova Zelanda)	EF675179
CCMEE5703	<i>Galdieria maxima</i>	Waimangu (Nuova Zelanda)	EF675165
CCMEE5714	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Waimangu (Nuova Zelanda)	EF675180
CCMEE5704	<i>Galdieria maxima</i>	Waimangu (Nuova Zelanda)	EF675128
CCMEE5717	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Rotorua (Nuova Zelanda)	EF675176
CCMEE5705	<i>Galdieria maxima</i>	Rotowhero (Nuova Zelanda)	EF675166
CCMEE5706	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Craters of the Moon (Nuova Zelanda)	EF675177
CCMEE5712	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Craters of the Moon (Nuova Zelanda)	EF675178
CCMEE5716	<i>Galdieria maxima</i>	Craters of the Moon (Nuova Zelanda)	EF675142
CCMEE5631	<i>Cynidioschyzon merolae</i>	Extremesite, Norris Basin, YNP (USA)	EF675140
CCMEE5573	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Extremesite, Norris Basin, YNP (USA)	EF675171
CCMEE5572	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Extremesite, Norris Basin, YNP (USA)	EF675182
CCMEE5511	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Extremesite, Norris Basin, YNP (USA)	EF675174
CCMEE5639	<i>Cynidioschyzon merolae</i>	Extremesite, Norris Basin, YNP (USA)	EF675127
CCMEE5640	<i>Cynidioschyzon merolae</i>	Extremesite, Norris Basin, YNP (USA)	EF675137
CCMEE5506	<i>Cynidioschyzon merolae</i>	Extremesite, Norris Basin, YNP (USA)	EF675146
CCMEE5507	<i>Cynidioschyzon merolae</i>	Extremesite, Norris Basin, YNP (USA)	EF675160
CCMEE5625	<i>Cynidioschyzon merolae</i>	Highland Creek, YNP (USA)	EF675158
CCMEE5576	<i>Cynidioschyzon merolae</i>	Lemonade Creek, YNP (USA)	EF675130
CCMEE5584	<i>Cynidioschyzon merolae</i>	Nymph Creek, YNP (USA)	EF675164
CCMEE5585	<i>Cynidioschyzon merolae</i>	Nymph Creek, YNP (USA)	EF675152
CCMEE5593	<i>Cynidioschyzon merolae</i>	Obsidian Creek, YNP (USA)	EF675124
CCMEE5610	<i>Cynidioschyzon merolae</i>	Sylvan Crust, YNP (USA)	EF675125
CCMEE5609	<i>Cynidioschyzon merolae</i>	Sylvan Springs, YNP (USA)	EF675144
CCMEE5680	<i>Galdieria maxima</i>	Kusatsu (Giappone)	EF675167
CCMEE5664	<i>Galdieria maxima</i>	Kusatsu (Giappone)	EF675145

CCMEE5681	<i>Galdieria maxima</i>	Kusatsu (Giappone)	EF675157
CCMEE5676	<i>Galdieria maxima</i>	Kusatsu (Giappone)	EF675143
CCMEE5678	<i>Galdieria maxima</i>	Kusatsu (Giappone)	EF675168
CCMEE5667	<i>Galdieria maxima</i>	Kusatsu (Giappone)	EF675151
CCMEE5665	<i>Galdieria maxima</i>	Kusatsu (Giappone)	EF675129
CCMEE5677	<i>Galdieria maxima</i>	Kusatsu (Giappone)	EF675132
CCMEE5679	<i>Galdieria maxima</i>	Kusatsu (Giappone)	EF675163
CCMEE5663	<i>Galdieria maxima</i>	Nakabusa (Japan)	EF675159
CCMEE5675	<i>Galdieria maxima</i>	Nakabusa (Giappone)	EF675155
CCMEE5674	<i>Galdieria maxima</i>	Nakabusa (Giappone)	EF675153
CCMEE5660	<i>Galdieria maxima</i>	Nakabusa (Giappone)	EF675156
CCMEE5662	<i>Galdieria maxima</i>	Nakabusa (Giappone)	EF675154
CCMEE5661	<i>Galdieria maxima</i>	Nakabusa (Giappone)	EF675150
CCMEE5673	<i>Galdieria maxima</i>	Owakudani (Giappone)	EF675141
CCMEE5657	<i>Galdieria maxima</i>	Owakudani (Giappone)	EF675139
CCMEE5671	<i>Galdieria maxima</i>	Owakudani (Giappone)	EF675133
CCMEE5672	<i>Galdieria maxima</i>	Owakudani (Giappone)	EF675131
CCMEE5658	<i>Galdieria maxima</i>	Owakudani (Giappone)	EF675162
CCMEE5670	<i>Galdieria maxima</i>	Owakudani (Giappone)	EF675148
CCMEE5659	<i>Galdieria maxima</i>	Owakudani (Giappone)	EF675138
CCMEE5668	<i>Galdieria maxima</i>	Owakudani (Giappone)	EF675136
CCMEE5669	<i>Galdieria maxima</i>	Owakudani (Giappone)	EF675126
ACUF427	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Gunnhuver (Islanda)	KC883847
ACUF376	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Gunnhuver (Islanda)	KC883806
ACUF380	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Gunnhuver (Islanda)	KC883807
ACUF381	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Gunnhuver (Islanda)	KC883808
ACUF413	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Gunnhuver (Islanda)	KC883835
ACUF382	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Gunnhuver (Islanda)	KC883809
ACUF383	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Gunnhuver (Islanda)	KC883810
ACUF384	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Gunnhuver (Islanda)	KC883811
ACUF385	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Landmannalaugar (Islanda)	KC883812
ACUF386	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Landmannalaugar (Islanda)	KC883813
ACUF387	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Landmannalaugar (Islanda)	KC883814
ACUF388	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Landmannalaugar (Islanda)	KC883815
ACUF419	<i>Galdieria maxima</i>	Landmannalaugar (Islanda)	KC883840
ACUF420	<i>Galdieria maxima</i>	Landmannalaugar (Islanda)	KC883841
ACUF421	<i>Galdieria maxima</i>	Landmannalaugar (Islanda)	KC883842
ACUF428	<i>Galdieria maxima</i>	Landmannalaugar (Islanda)	KC883848
ACUF449	<i>Galdieria maxima</i>	Landmannalaugar (Islanda)	KC883861
ACUF450	<i>Galdieria maxima</i>	Landmannalaugar (Islanda)	KC883862
ACUF456	<i>Galdieria maxima</i>	Landmannalaugar (Islanda)	KC883868
ACUF457	<i>Galdieria maxima</i>	Landmannalaugar (Islanda)	KC883869
ACUF458	<i>Galdieria maxima</i>	Landmannalaugar (Islanda)	KC883870
ACUF451	<i>Galdieria maxima</i>	Landmannalaugar (Islanda)	KC883863
ACUF389	<i>Galdieria maxima</i>	Seltun (Islanda)	KC883816
ACUF390	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Seltun (Islanda)	KC883817
ACUF416	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Seltun (Islanda)	KC883838
ACUF392	<i>Galdieria maxima</i>	Seltun (Islanda)	KC883818
ACUF393	<i>Galdieria maxima</i>	Seltun (Islanda)	KC883819
ACUF395	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Seltun (Islanda)	KC883820
ACUF396	<i>Galdieria maxima</i>	Seltun (Islanda)	KC883821
ACUF397	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Seltun (Islanda)	KC883822

ACUF398	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Seltun (Islanda)	KC883973
ACUF422	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Seltun (Islanda)	KC883843
ACUF423	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Seltun (Islanda)	KC883844
ACUF424	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Seltun (Islanda)	KC883845
ACUF425	<i>Galdieria maxima</i>	Seltun (Islanda)	KC883846
ACUF436	<i>Galdieria maxima</i>	Seltun (Islanda)	KC883849
ACUF437	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Seltun (Islanda)	KC883850
ACUF409	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Seltun (Islanda)	KC883831
ACUF448	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Seltun (Islanda)	KC883860
ACUF452	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Seltun (Islanda)	KC883864
ACUF439	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Seltun (Islanda)	KC883852
ACUF454	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Seltun (Islanda)	KC883866
ACUF440	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Seltun (Islanda)	KC883853
ACUF468	<i>Galdieria maxima</i>	Seltun (Islanda)	KC883880
ACUF469	<i>Galdieria maxima</i>	Seltun (Islanda)	KC883881
ACUF470	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Seltun (Islanda)	KC883882
ACUF472	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Seltun (Islanda)	KC883883
ACUF473	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Seltun (Islanda)	KC883884
ACUF474	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Seltun (Islanda)	KC883885
ACUF475	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Seltun (Islanda)	KC883886
ACUF459	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Seltun (Islanda)	KC883871
ACUF460	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Seltun (Islanda)	KC883872
ACUF410	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Seltun (Islanda)	KC883832
ACUF411	<i>Galdieria maxima</i>	Seltun (Islanda)	KC883833
ACUF463	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Seltun (Islanda)	KC883875
ACUF417	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Seltun (Islanda)	KC883839
ACUF412	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Seltun (Islanda)	KC883834
ACUF399	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Niasjvellir (Islanda)	KC883823
ACUF400	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Niasjvellir (Islanda)	KC883824
ACUF402	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Niasjvellir (Islanda)	KC883825
ACUF403	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Niasjvellir (Islanda)	KC883826
ACUF404	<i>Galdieria maxima</i>	Niasjvellir (Islanda)	KC883827
ACUF405	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Niasjvellir (Islanda)	KC883828
ACUF407	<i>Galdieria maxima</i>	Niasjvellir (Islanda)	KC883829
ACUF408	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Niasjvellir (Islanda)	KC883830
ACUF414	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Niasjvellir (Islanda)	KC883836
ACUF415	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Niasjvellir (Islanda)	KC883837
ACUF438	<i>Galdieria maxima</i>	Niasjvellir (Islanda)	KC883851
ACUF442	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Niasjvellir (Islanda)	KC883854
ACUF443	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Niasjvellir (Islanda)	KC883855
ACUF444	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Niasjvellir (Islanda)	KC883856
ACUF445	<i>Galdieria maxima</i>	Niasjvellir (Islanda)	KC883857
ACUF446	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Niasjvellir (Islanda)	KC883858
ACUF447	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Niasjvellir (Islanda)	KC883859
ACUF453	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Viti (Islanda)	KC883865
ACUF455	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Viti (Islanda)	KC883867
ACUF461	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Viti (Islanda)	KC883873
ACUF462	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Viti (Islanda)	KC883874
ACUF464	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Viti (Islanda)	KC883876
ACUF465	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Viti (Islanda)	KC883877
ACUF466	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Viti (Islanda)	KC883878
ACUF467	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Viti (Islanda)	KC883879

DRG05	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Taiwan	KJ125471
DYK02	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Taiwan	KJ125470
DYK01	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Taiwan	KJ125469
GZP01	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Taiwan	KJ125468
CJH-2014_DRG04	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Taiwan	KJ125467
DRG03	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Taiwan	KJ125466
DRG02	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Taiwan	KJ125465
THAL001	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Taiwan	KJ125464
CJG_SulfurFume	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Taiwan	JX912148
CHJ-5	<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	Crater Hills, YNP (USA)	JQ269634
CHJ-4	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Crater Hills, YNP (USA)	JQ269635
DSB-9	<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	Norris Geyser Basin, YNP (USA)	JQ269617
DSC-8	<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	Norris Geyser Basin, YNP (USA)	JQ269618
DSD-7	<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	Norris Geyser Basin, YNP (USA)	JQ269605
DSE-8	<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	Norris Geyser Basin, YNP (USA)	JQ269619
DSF-12	<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	Norris Geyser Basin, YNP (USA)	JQ269620
DSH-4	<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	Norris Geyser Basin, YNP (USA)	JQ269606
DS1-6	<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	Norris Geyser Basin, YNP (USA)	JQ269623
DS1-9	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Norris Geyser Basin, YNP (USA)	JQ269631
DS2-5	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Norris Geyser Basin, YNP (USA)	JQ269629
DS2-2	<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	Norris Geyser Basin, YNP (USA)	JQ269638
DS3-3	<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	Norris Geyser Basin, YNP (USA)	JQ269624
DS3-1	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Norris Geyser Basin, YNP (USA)	JQ269633
SFFL-8	<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	Fairy Falls Trailhead, YNP (USA)	JQ269615
SFFL-5	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Fairy Falls Trailhead, YNP (USA)	JQ269630
SFFR-7	<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	Fairy Falls Trailhead, YNP (USA)	JQ269616
LCASUB-11	<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	Lemonade Creek, YNP (USA)	JQ269627
LCATERR-5	<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	Lemonade Creek, YNP (USA)	JQ269607
LCATERR-7	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Lemonade Creek, YNP (USA)	JQ269608
LCBCEL-5	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Lemonade Creek, YNP (USA)	JQ269609
LCBCEL-7	<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	Lemonade Creek, YNP (USA)	JQ269610
LCBSUB-5	<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	Lemonade Creek, YNP (USA)	JQ269628
LCBTERR-12	<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	Lemonade Creek, YNP (USA)	JQ269611
LCBTERR-6	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Lemonade Creek, YNP (USA)	JQ269612
LCCBLGR-8	<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	Lemonade Creek, YNP (USA)	JQ269613
LCCYEGR-4	<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	Lemonade Creek, YNP (USA)	JQ269614
NCB-4	<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	Nymph Creek, YNP (USA)	JQ269621
RIVER1B-5	<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	Monument Basin, YNP (USA)	JQ269636
SSI-6	<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	Norris Geyser Basin, YNP (USA)	JQ269622
SSII-1	<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	Norris Geyser Basin, YNP (USA)	JQ269626
TS-4	<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	Norris Geyser Basin, YNP (USA)	JQ269637
9.2.4	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Germencik (Turchia)	Nuova sequenza
3.3.4	<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	Biloris (Turchia)	Nuova sequenza
1.2.7	<i>Galdieria phlegrea</i>	Cermik (Turchia)	Nuova sequenza
9.2.22	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Germencik (Turchia)	Nuova sequenza
9.2.23	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Germencik (Turchia)	Nuova sequenza
1.1.14	<i>Cyanidium caldarium</i>	Cermik (Turchia)	Nuova sequenza
7.7.10	<i>Cyanidium caldarium</i>	Diyadin (Turchia)	Nuova sequenza
1.1.3	<i>Galdieria maxima</i>	Cermik (Turchia)	Nuova sequenza

1.1.10	<i>Galdieria maxima</i>	Cermik (Turchia)	Nuova sequenza
1.2.6	<i>Galdieria maxima</i>	Cermik (Turchia)	Nuova sequenza
1.2.24	<i>Galdieria maxima</i>	Cermik (Turchia)	Nuova sequenza
3.4.16	<i>Galdieria maxima</i>	Biloris (Turchia)	Nuova sequenza
5.1.2	<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	Nemrut (Turchia)	Nuova sequenza
3.8.22	<i>Galdieria maxima</i>	Biloris (Turchia)	Nuova sequenza
7.6.3	<i>Galdieria maxima</i>	Diyadin (Turchia)	Nuova sequenza
7.6.18	<i>Galdieria maxima</i>	Diyadin (Turchia)	Nuova sequenza
9.2.7	<i>Galdieria maxima</i>	Germencik (Turchia)	Nuova sequenza
3.8.21	<i>Galdieria maxima</i>	Biloris (Turchia)	Nuova sequenza
8.1.9	<i>Galdieria maxima</i>	Manisa Kula (Turchia)	Nuova sequenza
1.1.4	<i>Galdieria phlegrea</i>	Cermik (Turchia)	Nuova sequenza
1.1.5	<i>Galdieria phlegrea</i>	Cermik (Turchia)	Nuova sequenza
1.2.11	<i>Galdieria phlegrea</i>	Cermik (Turchia)	Nuova sequenza
1.2.22	<i>Galdieria phlegrea</i>	Cermik (Turchia)	Nuova sequenza
9.2.9	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Germencik (Turchia)	Nuova sequenza
7.6.16	<i>Galdieria maxima</i>	Diyadin (Turchia)	Nuova sequenza
4.4.4	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Güçlükönak (Turchia)	Nuova sequenza
4.1.14	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Güçlükönak (Turchia)	Nuova sequenza
4.5.12	<i>Galdieria maxima</i>	Güçlükönak (Turchia)	Nuova sequenza
4.2.3	<i>Galdieria phlegrea</i>	Güçlükönak (Turchia)	Nuova sequenza
7.7.1	<i>Galdieria phlegrea</i>	Diyadin (Turchia)	Nuova sequenza
4.2.10	<i>Galdieria maxima</i>	Güçlükönak (Turchia)	Nuova sequenza
4.2.5	<i>Galdieria phlegrea</i>	Güçlükönak (Turchia)	Nuova sequenza
7.7.14	<i>Galdieria phlegrea</i>	Diyadin (Turchia)	Nuova sequenza
3.4.4	<i>Galdieria phlegrea</i>	Biloris (Turchia)	Nuova sequenza
1.3.23	<i>Galdieria phlegrea</i>	Cermik (Turchia)	Nuova sequenza
8.1.23	<i>Galdieria phlegrea</i>	Manisa Kula (Turchia)	Nuova sequenza
3.4.15	<i>Galdieria phlegrea</i>	Biloris (Turchia)	Nuova sequenza
1.2.11	<i>Galdieria phlegrea</i>	Cermik (Turchia)	Nuova sequenza
3.4.1	<i>Galdieria phlegrea</i>	Biloris (Turchia)	Nuova sequenza

Tab. 3 lista dei ceppi utilizzati per l'analisi filogenetica con relativi codici, luogo di provenienza e Accession Number.

Le analisi condotte sulla base della filogenesi del gene che codifica per la subunità maggiore della RubisCo hanno confermato la monofilia delle *Cyanidiophyceae*, che forma un sister group con le *Bangiophycidae* (Ciniglia et al., 2004; Yoon et al., 2006; Ciniglia et al., 2014) e la suddivisione della classe nelle quattro linee evolutive già identificate in Ciniglia et al nel 2004 (fig. 6). I risultati ottenuti hanno identificato solo due specie di *Cyanidiophyceae* in Islanda, *G. sulphuraria* e *G. maxima*, mentre il territorio turco offre una più ampia biodiversità: le sequenze ottenute fino ad oggi hanno identificato specie di *G. sulphuraria*, *G. maxima*, *G. phlegrea*, *C. merolae* e *C. caldarium*.

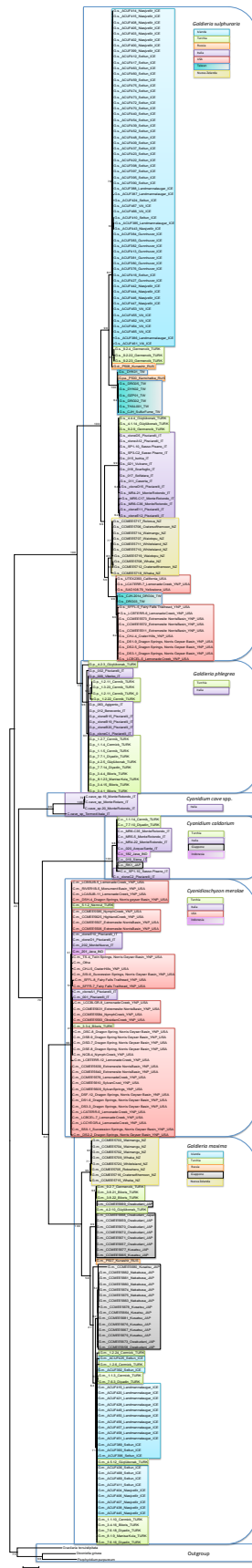


Fig. 6 Albero filogenetico maximum likelihood basato sulle sequenze dell'*rbcL*. I valori di bootstrap sono indicati vicino ai nodi; tra parentesi è indicato il numero degli isolati appartenenti a ciascuna regione geografica.

I nuovi isolati di *G. sulphuraria* ottenuti dal presente lavoro (59 ceppi islandesi e 3 ceppi turchi), insieme con *G. daedala* IPPAS P508, formano un unico raggruppamento, supportati da un discreto valore di bootstrap (82% MLB). In un cluster separato ricadono i nuovi ceppi provenienti da Taiwan (n = 7), insieme con *G. partita* IPPAS P500 del Kunashir (100% MLB di bootstrap). L'intero clade si raggruppa con i restanti isolati di *G. sulphuraria* raccolti nei diversi siti acido-termali mondiali: tra questi si identifica il gruppo di *G. sulphuraria* di origine italiana (n = 15), quello di origine neozelandese (n = 10) e un unico raggruppamento che include i taxa americani (n = 13) insieme con due nuovi ceppi provenienti da Taiwan.

I 24 ceppi islandesi di *G. maxima*, insieme con 10 isolati di origine turca si raggruppano nello stesso clade supportati da un buon valore di bootstrap (71% mlb); in un altro subclade ricadono gli isolati provenienti dal Giappone (n = 15). Altri 4 isolati turchi clusterizzano con altri 10 isolati di provenienza giapponese insieme con la *G. maxima* IPPAS P507 di Kunashir (Isole Curili, Russia). L'intero subclade descritto fino ad adesso, infine clusterizza con i ceppi provenienti dalla Nuova Zelanda (n = 8) supportati da un valore di bootstrap del 100%.

Il clade che raggruppa tutti i taxa di *C. merolae* evidenzia l'assenza di una struttura biogeografica: il grado di diversità genetica tra i diversi isolati è estremamente basso, come si evince dalla dimensione ridotta dei rami in questa porzione di albero filogenetico. I nuovi isolati turchi (n = 2) si raggruppano in questo mega clade dove ricadono anche i taxa di origine americana dello Yellowstone National Park (n = 37), quelli di origine italiana (n = 5) insieme con il ceppo 201 di Java (Indonesia, 99% di bootstrap).

Tra gli isolati di origine turca, fino ad oggi, è stato individuato un cospicuo numero di individui appartenenti al taxa di *G. phlegrea* (n = 15) e formano un unico raggruppamento insieme con i ceppi italiani (n = 8), con un livello di distanza genetica interpopolazione estremamente bassa, al pari di *C. merolae*.

Nessun ritrovamento in Islanda di *C. caldarium*, presente invece tra i ceppi di origine turca (n = 2), che si vanno ad unire agli altri isolati di origina italiana (n = 7), insieme con l'unico isolato indonesiano dell'isola di Java e il ceppo giapponese RK1.

4.2 VALUTAZIONE DELLE LINEE EVOLUTIVE NEL GENERE *GALDIERIA*

Per studiare la dispersione e la distribuzione delle *Cyanidiophyceae* su scala globale è stata analizzata nel dettaglio la struttura genetica delle popolazioni di *G. sulphuraria*, *G. maxima* e *C. merolae*. Le analisi della diversità genetica intra ed interpopolazione delle *Cyanidiophyceae* è stata eseguita con l'ausilio del software DNAsp, un programma in grado di analizzare il polimorfismo nucleotidico tra le sequenze di DNA e fornisce una stima quantitativa della variazione genetica tra gli individui. Il software esegue anche test di neutralità che esprimono il grado di espansione di una popolazione.

Tutte le sequenze nucleotidiche di *rbcL* disponibili ($n = 271$) sono state raggruppate in filotipi sulla base dell'identificazione morfologica e molecolare; in tabella 4 sono riportati i filotipi e per ciascuno di essi il numero di aplotipi, la distribuzione geografica e l'accession number di un aplotipo rappresentativo.

Filotipo (specie)	Aplotipo (N. individui)	GeneBank	Posizione geografica
A <i>(G. sulphuraria)</i>	1A (52)	KC883847	Islanda
	2A (1)	KC883814	Islanda
	3A (1)	KC883873	Islanda
	4A (3)	Nuova sequenza	Turchia
	5A (1)	KC883845	Islanda
	6A (1)	KC883873	Islanda
	7A (1)	AY541302	Kunashir
	8A (2)	KC883832	Islanda
	9A (1)	KC883812	Islanda
	10A (2)	KJ125466	Taiwan
	11A (3)	AY119767	USA
	12A (8)	EF675171	USA
	13A (1)	JQ269612	USA
	14A (1)	JQ269630	USA
	15A (6)	EF675183	Nuova Zelanda
	16A (1)	EF675175	Nuova Zelanda
	17A (1)	EF675179	Nuova Zelanda
	18A (2)	EF675172	Nuova Zelanda
	19A (11)	AY541304	Italia/Turchia
	20A (1)	DQ916745	Italia
	21A (1)	AY541303	Italia
	22A (1)	AY541322	Italia
	23A (1)	DQ916747	Italia
	24A (2)	AY541324	Italia
	25A (1)	DQ916746	Italia
	26A (6)	KJ125471	Taiwan
	27A (2)	AB18008	Taiwan/Russia
B <i>(G. maxima)</i>	1B (28)	KC883818	Islanda/Turchia
	2B (1)	KC883821	Islanda
	3B (6)	EF675157	Giappone
	4B (1)	EF675145	Giappone
	5B (2)	EF675159	Giappone

	6B (1)	EF675168	Giappone
	7B (2)	Nuova sequenza	Turchia
	8B (1)	Nuova sequenza	Turchia
	9B (1)	KC883846	Islanda
	10 B (1)	Nuova sequenza	Turchia
	11B (11)	AY391370/Nuova sequenza	Russia/Turchia/Giappone
	12B (3)	Nuova sequenza	Turchia
	13B (1)	EF675149	Nuova Zelanda
	14B (2)	EF675128	Nuova Zelanda
	15B (5)	EF675161	Nuova Zelanda
	16B (1)	EF675167	Giappone
C (<i>C. merolae</i>)	1C (13)	AY541320/Nuova sequenza	Indonesia/Italia/IUSA/Turchia
	2C (1)	JQ269637	USA
	3C (1)	D89861	USA
	4C (1)	AY541312	Italia
	5C (1)	Nuova sequenza	Turchia
	6C (1)	JQ269622	USA
	7C (1)	JQ269616	USA
	8C (1)	JQ269615	USA
	9C (9)	AY119766	Italia/Turchia/USA
	10C (1)	JQ269618	USA
	11C (1)	JQ269613	USA
	12C (12)	EF675127	USA
	13C (1)	JQ269638	USA
	14C (1)	JQ269611	USA
D (<i>G. phlegrea</i>)	1D (17)	AY119768	Italia
	2D (1)	AY541311	Italia

	3D (3)	Nuova sequenza	Turchia
	4D (1)	Nuova sequenza	Turchia
	5D (1)	Nuova sequenza	Turchia
E (<i>C. caldarium</i>)	1E (9)	AY541298/Nuova sequenza	Giappone/Italia/Indonesia/Turchia
	2E (1)	DQ916753	Italia
	3E (1)	AY541318	Italia
F (<i>Cyanidium</i> sp.cave)	1E (2)	AY541300	Italia
	2E (1)	AY541301	Italia
	3E (1)	KC914876	Italia

Tab. 4 filotipi con il numero di aplotipi, la distribuzione geografica e l'accession number di un aplotipo rappresentativo.

4.2.1 *GALDIERIA SULPHURARIA*

4.2.1.1 STATISTICA DI POPOLAZIONE *G. SULPHURARIA*

Le analisi in *G. sulphuraria* hanno rivelato la presenza di 69 siti variabili in 27 aplotipi, su un totale di 114 sequenze disponibili (Tab 5). Il livello di diversità genetica (h) è pari a $0,775 \pm 0,039$, mentre la diversità nucleotidica (π) risulta pari a $0,04224 \pm 0,00271$. La popolazione italiana possiede la più elevata diversità aplotidica ($h = 0,724 \pm 0,121$) seguita dalla popolazione neozelandese ($h = 0,644 \pm 0,152$), americana ($h = 0,603 \pm 0,131$) e da quella islandese ($h = 0,224 \pm 0,072$). L'analisi non può essere applicata per i ceppi provenienti dalla Russia a causa dell'insufficiente numero di sequenze disponibili. Nei test di neutralità eseguiti su *G. sulphuraria* i valori del Tajima D e Fu & Li F^* sono significativamente negativi per la popolazione islandese ($D = -1,9536$ e $F^* = -3,3374$) e per la popolazione americana ($D = -1,7911$ e $F^* = -2,3015$) sebbene anche per le popolazioni italiana e neozelandese i valori sono sempre minori di zero. Il valore $D < 0$ è indice di due informazioni: a) popolazione in espansione quando la popolazione ha iniziato recentemente ad espandersi e le mutazioni occorrono ma hanno ancora una frequenza

troppo bassa per poter contribuire alla eterozigosità; b) selezione purificante, ovvero le mutazioni si sono accumulate in siti silenti, che non si fissano nella popolazione e non generano eterozigosità. Analizzando la popolazione totale di *G. sulphuraria*, i

valori di Tajima D e Fu&Li F* sono entrambi positivi; ciò è espressione di un ridotto numero di individui nella popolazione con un'elevata diversità aplotidica ed è indice di possibile deriva genetica durante la quale alcuni alleli vengono persi nella selezione, mentre altri si fissano nella popolazione aumentando la propria frequenza. L'ipotesi alternativa è quella della overdominanza di aplotipi con una maggiore fitness.

Filotipo	Regione	N	v	N	h ± sd	π ± sd	TajimaD	FuLiF*
G. sulphuraria	ALL	114	69	27	0,775 ± 0,039	0,04224 ± 0,00271	0,48573	0,2456
	IT	15	8	7	0,724 ± 0,121	0,00301 ± 0,00089	-1,7439	-1,9927
	NZ	10	5	4	0,644 ± 0,152	0,00268 ± 0,00108	-1,3882	-1,5219
	USA	13	5	4	0,603 ± 0,131	0,00211 ± 0,00091	-1,7911*	-2,3015*
	TW	9	35	1	0,556 ± 0,165	0,0318 ± 0,0132	0,3308	1,4614
	RUS	2	16	2	1,000 ± 0,500	0,03712 ± 0,01856	0,000	0,000
	ICE	59	6	7	0,224 ± 0,072	0,00062 ± 0,00022	-1,9536*	-3,3374*
	TURK	6	35	2	0,600 ± 0,129	0,04872 ± 0,01048	2,3533*	2,0365*

Tab. 5 Statistica di popolazione dell' *rbcL* di *Galdieria sulphuraria* n. numero di campioni, N. numero di aplotipi, v. numero di siti variabili, h. diversità aplotipica, π. diversità nucleotidica, SD. Deviazione standard. * Significatività del test, P value < 0.05

4.2.1.2 NETWORK DI APLOTIPI E NESTED CLADE ANALYSIS (NCA) PER *G. SULPHURARIA*

Nel filotipo di *G. sulphuraria*, i 27 aplotipi individuati si risolvono in 5 network separati, identificati con sigle alfanumeriche (GS-AI, GS-AII, GS-AIII, GS-AIV, GS-AV) (Fig. 7). Le connessioni tra questi network non possono essere verificate, dal momento che il numero di mutazioni che separa i distinti network è superiore al numero di connessioni mutazionali tra coppie di sequenze giustificato dal criterio della parsimonia con una probabilità fissata al 95%. Il network GS-AI connette gli aplotipi islandesi (1A, 2A, 3A, 5A, 6A, 8A e 9A) con quelli provenienti dalla Turchia (4A), insieme con l'aplotipo russo (7A). Il network GS-AII comprende individui raccolti allo Yellowstone National Park negli USA (11A, 12A, 13A e 14A), insieme con l'aplotipo 10A condiviso da due individui provenienti da Taiwan. Gli aplotipi neozelandesi si raccolgono tutti nel network GS-AIII (15A, 16A, 17A e 18A). Il

network GS-AIV comprende un aplotipo condiviso da isolati di origine italiana e isolati di origine turca (19A) a cui si collegano diversi aplotipi italiani (20A, 21A, 22A, 23A, 24A e 25A). Infine il network GS-AV collega alcuni isolati di Taiwan, che costituiscono un solo aplotipo (26A), insieme con l'aplotipo 27A formato da un altro ceppo di Taiwan insieme con *G. partita* della Kamchatka.

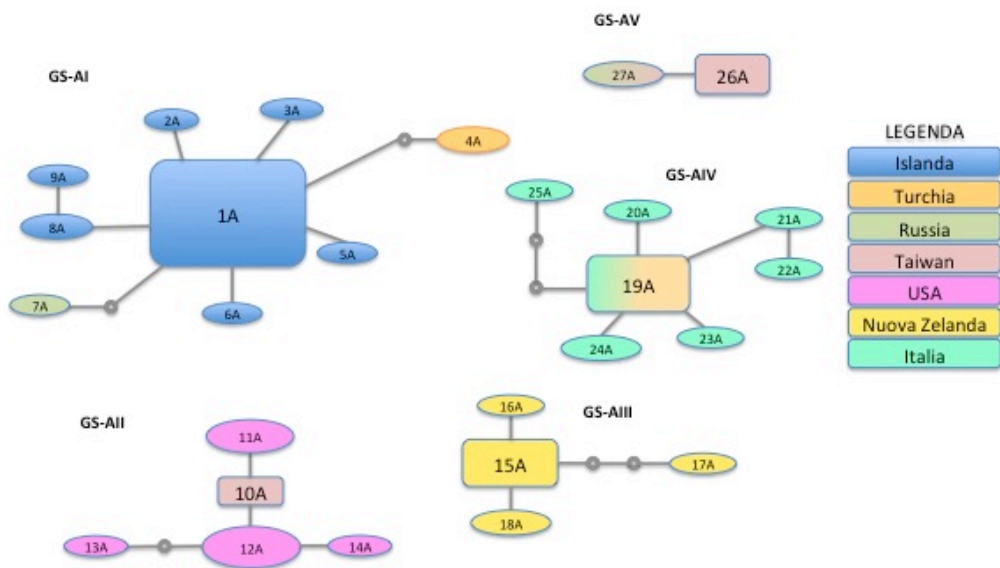


Fig. 7 Network di aplotipi di *G. sulphuraria*

	GS-AI	GS-AII	GS-AIII	GS-AIV	GS-AV
GS-AI	0,491	—	—	—	—
GS-AII	28,105	1,138	—	—	—
GS-AIII	24,738	17,867	1,040	—	—
GS-AIV	33,706	31,167	23,789	1,025	—
GS-AV	16,972	35,550	32,050	33,250	0,375

Tab. 6 Distanze genetiche tra gli aplotipi dello stesso network e tra network diversi nel filotipo di *G. sulphuraria*

Le distanze genetiche tra gli aplotipi di ogni singolo network e tra i diversi network sono riportate in tabella 6. Gli aplotipi entro lo stesso network mostrano un basso livello di variazione genetica che va da 0,375 (GS-AV, ovvero il network che raggruppa la maggior parte degli aplotipi di Taiwan e l'unico aplotipo disponibile della Kamchatka, *G. partita*) a 1,138 (GS-AII, che connette aplotipi americani con un aplotipo di Taiwan); più rimarchevole è invece la distanza genetica tra i diversi network, per i quali l'intervallo è pari a 17,867 (tra GS-AII, USA+Taiwan e GS-AIII, Nuova Zelanda) e 35,550 (tra GS-AII,

USA e GS-AV, Taiwan+ Kamchatka). Altrettanto distanti geneticamente in modo significativo sono tra loro i network GS-AI, comprendente aplotipi islandesi e turchi, e GS-AIV, in cui confluiscono gli aplotipi italiani ed altri aplotipi turchi.

In termini di associazioni geografiche, sia in Turchia, sia a Taiwan vi sono almeno due popolazioni aplotipiche significativamente distinte l'una dall'altra da un punto di vista molecolare, mentre nessun aplotipo neozelandese o islandese è condiviso da altre aree geografiche esplorate.

La Nested Clade Analysis è stata eseguita sui network GS-AI, GS-AII e GS-AIV, poiché sono gli unici network a possedere una seppur limitata diversità genetica e geografica. All'interno dei singoli network, l'analisi della contingenza è stata applicata per i clade nestati 1-1 e 2-1 per quanto riguarda i network GS-AI e GS-A2, 1-1, 2-1 e 3-1 per quanto riguarda il network GS-A3 in quanto sono gli unici costituiti da almeno due aplotipi differenti provenienti da diversi siti geografici. Nella figura seguente (Fig. 8a, fig. 8b, fig. 8c) sono riportate le strutture dalla NCA per ogni network considerato e associate ad esse sono riportati nella tabella 7 i valori ottenuti dall'analisi con la relativa significatività.

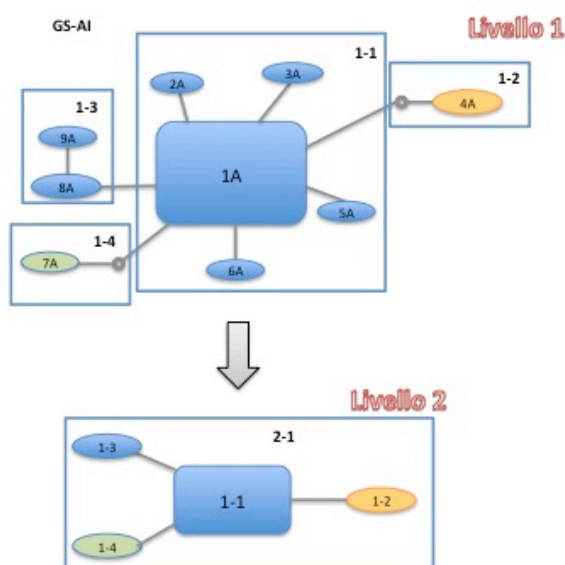


Fig. 8a Nested clade per il Network GS-AI

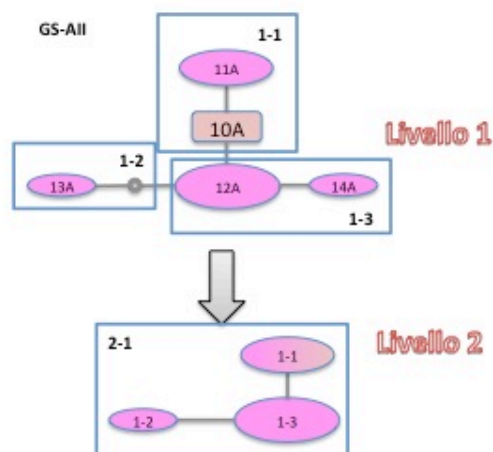


Fig. 8b Nested clade per il network GS-AII

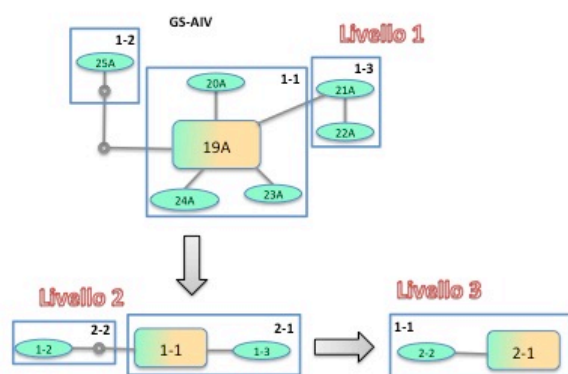


Fig. 8c Nested clade per il network GS-AIV

<i>G. sulphuraria</i>	Network GS-AI	
	X ²	P-value
2-1	122,000	0,000,
<i>G. sulphuraria</i>	Network GS-AII	
	X ²	P-value
1-1	5,000	0,079
2-1	4,6154	0,248
<i>G. sulphuraria</i>	Network GS-AIV	
	X ²	P-value
1-1	1,3636	1,000
2-1	0,4857	1,000
3-1	0,2118	1,000

Tab. 7 Analisi della contingenza delle regioni geografiche con gli aplotipi appartenenti ai network GS-AI, GS-AII e GS-AIV

4.2.2 *GALDIERIA MAXIMA*

4.2.2.1 STATISTICA DI POPOLAZIONE DI *G. MAXIMA*

Le sequenze di *rbcL* di quegli isolati che si identificano nella specie di *G. maxima* ($n = 71$), presentano 59 siti variabili e 16 aplotipi (Tab. 8); le analisi evidenziano che la diversità aplotipica interpopolazione è più elevata ($h = 0,724 \pm 0,121$) rispetto a quella delle singole popolazioni. Nel dettaglio la popolazione islandese di *G. maxima* presenta la più bassa diversità aplotipica ($h = 0,163 \pm 0,099$) ed anche la più bassa diversità nucleotidica ($\pi = 0,00077 \pm 0,00054$) su un totale di 24 sequenze che si distribuiscono in soltanto 3 aplotipi. Le 8 sequenze di *rbcL* inserite nell'analisi che appartengono agli isolati provenienti dalla Nuova Zelanda sono caratterizzate da tre siti variabili che si riflettono in 3 aplotipi; la diversità aplotipica di questa popolazione è di $0,607 \pm 0,164$, mentre quella nucleotidica è di $0,00240 \pm 0,00098$. La popolazione giapponese è costituita da 24 isolati le cui sequenze mostrano 32 siti variabili e si distribuiscono in 6 aplotipi, la cui diversità è pari a $0,761 \pm 0,049$; $0,02266 \pm 0,00315$, invece, è il valore della diversità nucleotidica. Infine i ceppi di origine turca ($n = 14$) presentano un discreto livello di diversità nucleotidica ($\pi = 0,01741 \pm 0,00364$) e i sei aplotipi identificati hanno una diversità di $0,791 \pm 0,089$. I risultati dei Test di neutralità sulle popolazioni di *G. maxima* dimostrano che le popolazioni giapponesi e turche stanno subendo un processo di contrazione per semplice effetto della deriva genetica casuale essendo il valore di Tajima positivo anche se non in misura significativa ($D_{JAP} = 0,2770$ e $D_{TURK} = 0,8086$). Un valore negativo del Tajima si osserva, invece, per la popolazione neozelandese ($D = -0,4314$) e per la popolazione islandese ($D = -1,8838$), anche se solo in quest'ultimo caso i risultati delle analisi sono significativamente supportati da un valore di $p\text{-value} < 0,05$, indicando che queste popolazioni hanno subito nel corso della loro storia evolutiva un evento di selezione, come una "bottleneck selection", e sono ora in una fase di espansione in cui occorrono nuove mutazioni che nel corso degli anni contribuiranno all'eterozigosità della popolazione.

Filotipo	Regione	n	V	N	$h \pm sd$	$\pi \pm sd$	TajimaD	FuLiF*
<i>G. maxima</i>	ALL	71	59	16	$0,808 \pm 0,038$	$0,02844 \pm 0,00339$	-0,2491	-1,1192
	JAP	24	32	6	$0,761 \pm 0,049$	$0,02266 \pm 0,00315$	0,2770	-0,9901
	NZ	8	3	3	$0,607 \pm 0,164$	$0,00240 \pm 0,00098$	-0,4314	-0,6422

	ICE	24	4	3	0,163 ± 0,099	0,00077 ± 0,00054	-1,8838*	-2,9341*
	TURK	14	20	6	0,791 ± 0,089	0,01741 ± 0,00364	0,8086	0,7833

Tab. 8 Statistica di popolazione dell' *rbcL* di *Galdieria maxima*. n. numero di campioni, N. numero di aplotipi, v. numero di siti variabili, h. diversità aplotipica, π . diversità nucleotidica, SD. standard deviation. * Significatività del test, P value < 0.05

4.2.2.2 NETWORK DI APLOTIPI E NCA PER *G. MAXIMA*

Le 71 sequenze di *G. maxima* hanno generato quattro differenti network (Fig.9), di cui due costituiti da aplotipi provenienti dallo stesso luogo geografico: GM-BIII che include solo aplotipi neozelandesi (13B, 14B e 15B). Secondo le analisi ottenute dal software TCS, sembra che i network GM-BI e GM-BII siano costituiti da aplotipi che non hanno una definita strutturazione geografica; di fatto al network GM-BII appartengono individui giapponesi che formano un unico aplotipo insieme con il ceppo di *G. maxima* proveniente dalla penisola della Kamchatka, Russia (11B) e con un isolato di origine turca; questo aplotipo si connette mediante un solo step mutazionale con un altro aplotipo costituito da ceppi provenienti dalla Turchia (12B). Gli aplotipi che appartengono al network GM-BI sono costituiti da individui che non hanno una chiara distribuzione geografica. L'aplotipo che si posiziona al centro del network comprende individui islandesi e turchi (1B); ad esso si collegano altri due aplotipi provenienti dall'Islanda (2B e 9B) e tre aplotipi provenienti dalla Turchia (7B, 8B e 10B). Leggermente distanziati dal resto del network si posizionano quattro aplotipi di origine giapponese (3B, 4B, 5B e 6B) che si separano dall'aplotipo IB per 5 passi mutazionali.

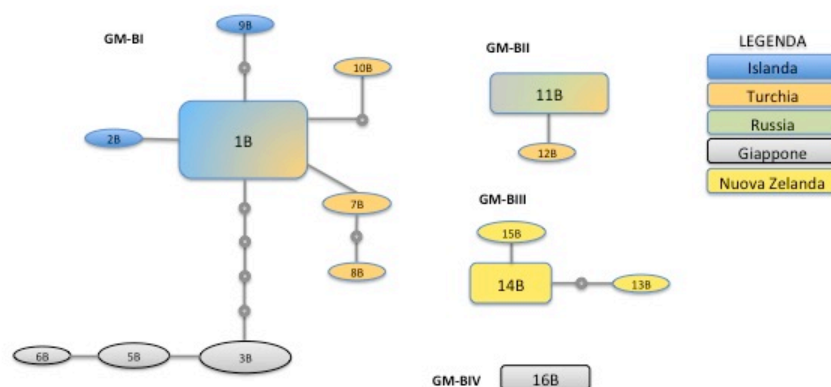


Fig. 9 Network di aplotipi di *G. sulphuraria*

	GM-BI	GM-BII	GM-BIII	GM-AIV
GM-BI	2,881	—	—	—
GM-BII	15,152	0,337	—	—
GM-BIII	30,479	30,839	0,906	—
GM-BIV	23,104	25,214	34,625	0

Tab. 9 Distanze genetiche tra gli aplotipi dello stesso network e tra network diversi nel filotipo di *G. maxima*

Il disegno dei cladi annidati sul network è rappresentato in Fig. 10 mentre l'analisi di permutazione dei cladi tra le popolazioni è mostrato in Tab. 9. La Nested Clade Analysis è stata applicata per il clade 1-1 al primo livello di raggruppamento dove sono presenti aplotipi islandesi, turchi nonché un aplotipo (1B) condiviso da entrambi i territori; al livello due di clusterizzazione il clade 2-1 comprende gli aplotipi già analizzati nel livello inferiore di raggruppamento insieme ad altri aplotipi esclusivamente di provenienza turca o islandese. Infine l'ultimo livello di associazione riguarda l'intero network e collega nello stesso clade nestato gli aplotipi descritti prima insieme con gli aplotipi di origine giapponese. Una associazione statisticamente significativa ($P < 0.05$) tra le località geografiche e i cladi è stata rilevata solo al livello dell'intero cladogramma. Dalla permutazione dei cladi contro le località si sono ottenute le significatività per le quantità Dc, Dn e I-T (Tab 10).

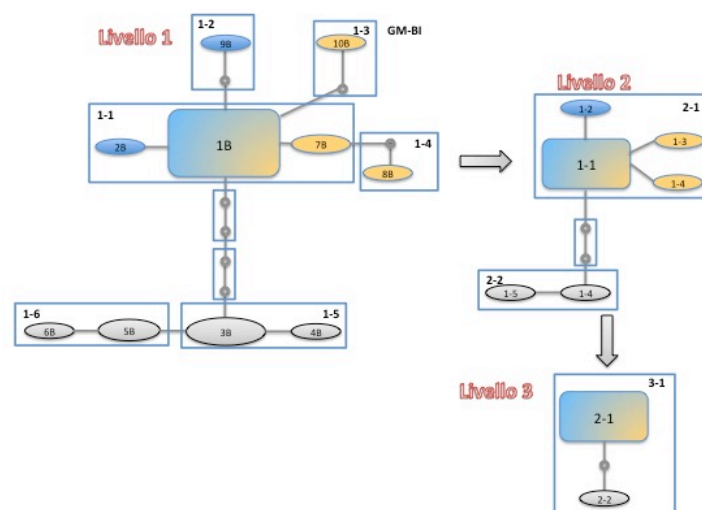


Fig. 10 Nested clade per il network GM-BI

<i>G. maxima</i>	Network GS-BI	
	X ²	P-value
1-1	6,378	0,059
2-1	5,411	0,192
3-1	49,000	0,000

Tab. 10 Analisi della contingenza delle regioni geografiche con con gli aplotipi appartenenti ai network GM-BI

4.2.3 *CYANIDIOSCHYZON MEROLAE*

4.2.3.1 STATISTICA DI POPOLAZIONE DI *C. MEROLAE*

La popolazione totale di *C. merolae*, costituita da 45 sequenze che presentano 17 siti variabili, è costituita da 14 aplotipi che hanno una diversità pari a $0,818 \pm 0,034$ e una diversità nucleotidica di $0,00354 \pm 0,00049$ (Tab. 11). I risultati ottenuti dai test di neutralità per questa popolazione sono significativamente negativi ($D = -1,9308$ e $F^* = -3,9627$), tipici di una popolazione che sta subendo un processo di espansione. Tra le sottopopolazioni individuate, quella americana, proveniente specificamente dallo Yellowstone National Park, presenta un valore significativamente negativo di Tajima D e Fu&Li F^* ($D = -1,8410$; $F^* = -3,5916$); essa è costituita da un discreto numero di isolati ($n = 37$), che si distribuiscono in 7 aplotipi, la cui diversità nucleotidica è di $0,00387 \pm 0,00056$, mentre quella aplotipica è pari a $0,827 \pm 0,040$. La popolazione di *C. merolae* italiana è costituita solamente da 5 individui che hanno una diversità aplotipica di $0,700 \pm 0,218$ e una diversità nucleotidica di $0,00186 \pm 0,00070$; secondo i test di neutralità, anche questa popolazione sta subendo un evento di espansione essendo i valori del test di Tajima D e Fu&Li F^* negativi anche se non in misura significativa ($D = -0,9726$; $F^* = -0,9544$). Va detto, però, che gli estesi

campionamenti eseguiti in Turchia, Islanda, Italia, Nuova Zelanda, USA e Giappone riferiscono una limitata presenza *C. merolae* tra tutte le *Cyanidiophyceae*, suggerendo probabilmente che questa specie ha una minore fitness rispetto alle altre; nell'ambito delle singole regioni, però, *C. merolae* genera un elevato numero di aplotipi rispetto al numero di sequenze determinate, con una diversità genetica molto elevata e ciò potrebbe essere spiegato dalla limitata capacità di dispersione intraregionale costringendo questa specie ad occupare specifiche nicchie ecologiche.

Filotipo	Regione	N	v	N	h ± sd	π ± sd	TajimaD	FuLiF*
C. merolae	ALL	45	17	14	0,818 ± 0,034	0,00354 ± 0,00049	-1,9308*	-3,9627*
	USA	37	16	7	0,827 ± 0,040	0,00387 ± 0,00056	-1,8410*	-3,5916*
	IT	5	2	3	0,700 ± 0,218	0,00186 ± 0,00070	-0,9726	-0,9544
	TURK	2	1	2	1,000 ± 0,500	0,00232 ± 0,00116	0,0000	0,0000

Tab. 11 Statistica di popolazione dell' rbcL di *Cyanidioschyzon merolae*. n. numero di campioni, N. numero di aplotipi, v. numero di siti variabili, h. diversità aplotipica, π. diversità nucleotidica, SD. standard deviation. * Significatività del test, P value < 0.05

4.2.3.2 NETWORK DI APLOTIPI E NESTED CLADE ANALYSIS (NCA)

Analizzando le 45 sequenze di rbcL appartenenti ai ceppi di *C. merolae*, il software TCS ha individuato un unico grande network (CM-CI) costituito da aplotipi che si separano al massimo per tre step mutazionali (Fig. 11). Gli individui americani si dividono in 13 aplotipi diversi (1C, 2C, 3C, 5C, 6C, 7C, 8C, 9C, 10C e 11C). L'aplotipo più abbondante (1C) si posiziona al centro del network e racchiude alcuni isolati provenienti dalla penisola italiana, insieme con un ceppo turco ed uno indonesiano oltre a comprendere alcuni ceppi americani. A questo aplotipo si connettono, mediante un singolo step mutazionale, 7 aplotipi esclusivamente di provenienza americana (2C, 3C, 5C, 6C, 7C e 12C) ed un aplotipo misto (9C) costituito da altri ceppi americani, insieme con un altro isolato italiano ed uno turco; ad esso si collegano gli aplotipi 10C e 11C mediante un singolo step mutazionale. Aplotipi più marginali rispetto al centro del network sono l'8C, il 13C e il 14C che si distanziano dagli altri per due o tre mutazioni.

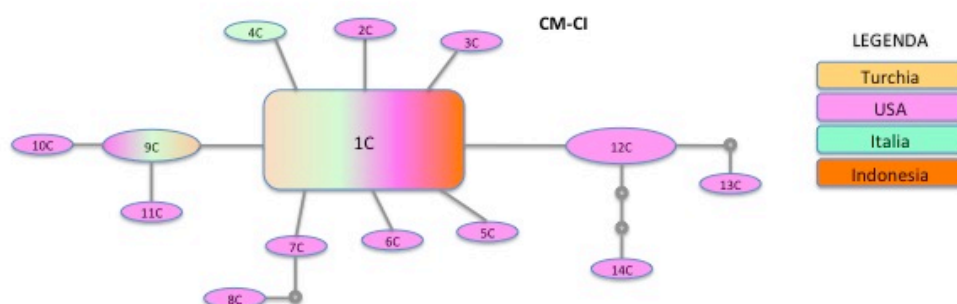


Fig. 11 Network di aplotipi di *c. merolae*

La nested clade analysis sull'unico network generato dal programma TCS, è stata applicata su tre livelli di raggruppamento: il clade 1-1 che comprende l'aplotipo condiviso dalle popolazioni italiane, turche, americane e indonesiane nestato con altri aplotipi di provenienza americana, il clade 2-1 che comprende gli stessi aplotipi del clade precedente, insieme con ulteriori aplotipi americani, il clade 3-1 che raggruppa tutti gli aplotipi del network (Fig. 12). I risultati ottenuti del chi-quadrato, mediante il test della contingenza, sono tutti non supportati significativamente dal p-value (Tab. 12).

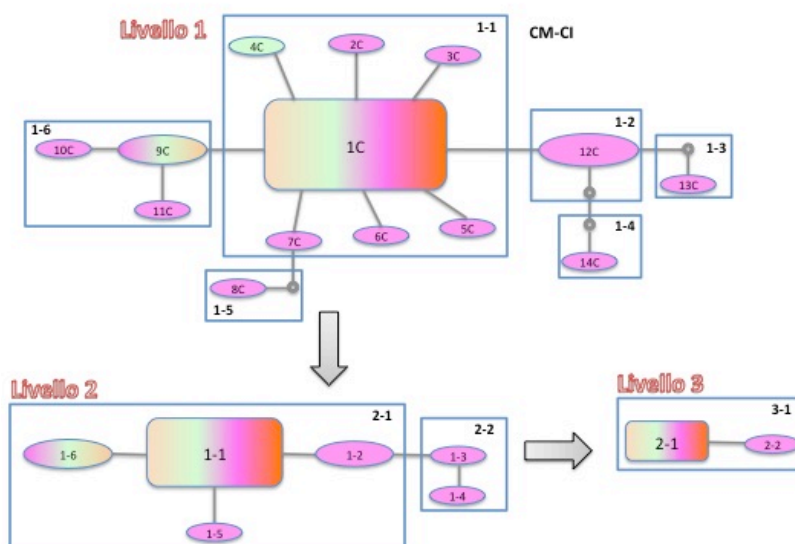


Fig. 12 Nested clade per il network CM-CI

C. merolae	Network CM-CI
------------	---------------

	X2	P-value
42005	6,465	0,928
42156	0,543	1,000
42006	6,319	0,570
42007	0,466	1,000

Tab. 12 Analisi della contingenza delle regioni geografiche con li aplotipi appartenenti al network CM-CI

4.3 ABBASSAMENTO DEL pH NEL MEZZO ESTERNO

Durante il processo fotosintetico, la CO₂ presente nel mezzo esterno è sottratta dalle cellule microalgali ed usata per il metabolismo fotoautotrofo; questa sottrazione produce un aumento del pH del terreno di coltura in maniera proporzionale rispetto all'avanzamento della crescita algale (Lowell&Castenholz, 2013). Alcuni ricercatori hanno dimostrato l'ulteriore capacità dei Cyanobacteria di assorbire la HCO₃⁻ e di convertirla in CO₂ mediante un'anidrasi carbonica intracellulare (Gao&Zou, 2001). Al contrario le *Cyanidiophyceae* hanno un pH ottimale di crescita esterno di 2-3 che rimane costante durante l'attività fotosintetica, pur avendo un pH intracellulare di 6.6-7 (Beardall&Entwistle, 1984; Enami et al., 1986). Alcuni autori hanno osservato un aumento del pH da un valore di 5.9 a 6.5 di una sospensione algale di cellule di *Cyanidium*, poste in acqua distillata e distrutte con la French Press. Queste osservazioni hanno suggerito che il pH intracellulare rimane costante su un valore neutro e che probabilmente *Cyanidium* è dotato di un meccanismo per mantenerlo tale (Enami&Fukuda, 1975; Enami et al., 2010). In ambienti estremamente acidi, tipici delle *Cyanidiophyceae*, gli ioni H⁺ entrano passivamente nelle cellule in conseguenza dell'eccessivo gradiente di pH; contemporaneamente la cellula elimina questo eccesso di ioni H⁺ pompandoli all'esterno contro gradiente mediante una pompa di membrana ATP-dipendente per mantenere il pH intracellulare in un range fisiologico (Enami et al., 2010). Nell'ambito del progetto di dottorato, è stata testata la capacità di diversi ceppi di *Cyanidiophyceae* di origine turca, italiana e islandese di modificare il pH del mezzo esterno, portandolo da valori neutri o subneutri a valori acidi. A tale scopo sono stati scelti per l'analisi sia ceppi provenienti da ambienti acidi, sia ceppi isolati in ambienti neutri, ma in grado di tollerare in laboratorio valori di pH molto bassi (pH 1.5). In tabella 13 sono riportati il codice dei ceppi utilizzati, il luogo di provenienza, la temperatura e il pH del sito di campionamento.

Ceppi	Sito di Campionamento	temperatura (°C)	pH
002	Pisciarelli (IT)	45°C	1
011	Mondragone (IT)	20°C	1
4.1.15	Güçlükönak (TR)	60°C	1
4.3.1	Güçlükönak (TR)	60°C	1
7.7.9	Diyadin (TR)	45°C	7
7.7.23	Diyadin (TR)	45°C	7
8.1.5	Kula, Manisa (TR)	41°C	7
8.1.7	Kula, Manisa (TR)	41°C	7
8.3.21	Landmannalaugar, Hekla (IS)	42°C	1

Tab 13 Codice, sito di campionamento con relativi valori di pH e temperatura per ogni ceppo analizzato

In tabella 14 sono riportati i valori di pH e le letture colorimetriche, espresse in OD, per i nove ceppi analizzati ad intervalli regolari di 168 ore, per una durata totale dell'esperimento di 1008 ore.

	Tempo 0		168 ore		336 ore		504 ore		672 ore		840 ore		1008 ore			Tempo 0		1008 ore	
pH 7	pH	OD	pH	OD	pH	OD	pH	OD	pH	OD	pH	OD	pH	OD	pH 1.5	pH	OD	pH	OD
002	6,71	0,384	5,60	0,652	4,34	1,395	3,10	2,648	2,74	4,748	2,48	8,650	2,29	15,140		1,30	0,379	1,16	14,390
011	6,51	0,388	6,40	0,262	6,33	0,264	6,27	0,252	6,19	0,356	5,98	0,422	5,68	0,668		1,29	0,361	1,13	19,670
4.1.15	6,46	0,353	6,05	0,505	4,76	0,688	3,16	1,222	2,80	2,110	2,53	3,780	2,33	5,465		1,42	0,396	1,33	13,420
4.3.1	6,50	0,365	6,12	0,518	4,26	0,614	3,05	0,827	2,74	1,318	2,47	2,055	2,25	2,955		1,30	0,383	1,15	16,240
7.7.9	6,51	0,372	6,29	0,354	5,33	0,702	3,34	0,748	2,81	1,107	2,55	2,405	2,37	4,210		1,30	0,405	1,24	13,910
7.7.23	6,55	0,382	5,86	0,735	3,39	1,045	2,90	1,331	2,66	2,042	2,44	3,380	2,17	5,175		1,33	0,382	1,21	13,070
8.1.5	6,38	0,433	5,67	0,545	3,42	1,342	2,81	2,652	2,77	4,830	2,56	6,745	2,42	11,620		1,49	0,404	1,18	23,910
8.1.7	6,58	0,324	6,48	0,184	6,14	0,379	4,64	0,877	3,00	2,214	2,62	3,026	2,91	10,590		1,33	0,394	1,15	18,660
8.3.21	6,48	0,305	6,09	0,721	3,54	1,556	3,00	2,492	2,72	7,060	2,40	11,700	2,16	17,960		1,46	0,401	1,20	15,860

	Tempo 0		168 ore		336 ore		504 ore		672 ore		840 ore		1008 ore			Tempo 0		1008 ore	
pH 6	pH	OD	pH	OD	pH	OD	pH	OD	pH	OD	pH	OD	pH	OD	pH 1.5	pH	OD	pH	OD
002	5,98	0,309	3,65	1,157	2,99	2,316	2,72	3,604	2,53	6,325	2,39	8,115	2,19	15,100		1,30	0,379	1,16	14,390
011	5,88	0,349	3,89	0,853	3,08	1,568	2,77	2,644	2,58	4,030	2,43	5,745	2,25	8,860		1,29	0,361	1,13	19,670
4.1.15	5,83	0,285	3,52	0,587	2,90	1,167	2,58	2,878	2,34	6,040	2,14	9,650	1,84	14,820		1,42	0,396	1,33	13,420
4.3.1	5,81	0,258	3,76	0,562	2,99	0,856	2,68	1,672	2,47	2,383	2,32	2,868	2,10	3,695		1,30	0,383	1,15	16,240
7.7.9	5,86	0,278	4,08	0,430	3,18	0,636	2,81	1,524	2,57	3,860	2,34	6,720	2,16	8,040		1,30	0,405	1,24	13,910
7.7.23	5,79	0,309	3,40	0,752	2,88	1,263	2,65	2,540	2,50	4,490	2,35	6,500	2,33	8,730		1,33	0,382	1,21	13,070
8.1.5	5,65	0,354	3,87	0,693	3,07	1,769	2,84	3,208	2,62	4,980	2,46	8,140	2,30	14,240		1,49	0,404	1,18	23,910
8.1.7	6,17	0,322	3,61	0,729	3,20	1,423	2,88	2,047	2,67	4,880	2,49	8,520	2,31	11,330		1,33	0,394	1,15	18,660
8.3.21	5,53	0,354	3,61	0,574	3,02	1,556	2,83	2,928	2,60	4,205	2,43	7,310	2,25	13,420		1,46	0,401	1,20	15,860

	Tempo 0		168 ore		336 ore		504 ore		672 ore		840 ore		1008 ore			Tempo 0		1008 ore	
pH 5	pH	OD	pH	OD	pH	OD	pH	OD	pH	OD	pH	OD	pH	OD	pH 1.5	pH	OD	pH	OD
002	5,38	0,337	3,51	1,181	2,35	1,872	2,68	3,640	2,55	5,330	2,41	8,040	2,26	12,260		1,30	0,379	1,16	14,390
011	5,08	0,367	3,13	1,114	2,80	1,991	2,47	3,990	2,32	7,110	2,08	13,560	2,16	17,112		1,29	0,361	1,13	19,670
4.1.15	5,03	0,279	3,41	0,401	3,04	1,140	2,77	1,701	2,58	3,705	2,42	6,830	2,14	10,640		1,42	0,396	1,33	13,420
4.3.1	4,88	0,252	3,28	0,610	2,93	1,181	2,54	1,880	2,43	2,505	2,26	2,502	2,16	4,925		1,30	0,383	1,15	16,240
7.7.9	4,83	0,366	3,71	0,593	3,19	1,178	2,80	1,751	2,56	3,260	2,32	6,520	1,99	10,960		1,30	0,405	1,24	13,910
7.7.23	4,70	0,274	3,12	0,860	2,81	1,589	2,53	3,123	2,46	5,680	2,24	7,930	2,14	13,830		1,33	0,382	1,21	13,070
8.1.5	5,03	0,391	3,27	1,163	2,89	1,902	2,75	3,250	2,56	5,435	2,44	12,770	2,28	13,120		1,49	0,404	1,18	23,910
8.1.7	4,84	0,321	3,44	0,796	3,16	1,443	2,86	2,693	2,69	4,240	2,55	7,100	2,22	10,220		1,33	0,394	1,15	18,660
8.3.21	5,12	0,340	3,35	0,810	2,94	1,860	2,81	2,395	2,55	5,560	2,40	7,475	2,27	14,450		1,46	0,401	1,20	15,860

Tab. 14 pH e letture colorimetriche per i nove ceppi analizzati

Dopo 168 ore di esperimento tra tutti i ceppi fatti crescere in Allen pH7, i ceppi 002, 7.7.23 e 8.1.5 hanno portato il valore di pH a valori subneutrale o debolmente acidi (5.60, 5.86 e 5.67), mentre tutti gli altri lo hanno ridotto solo di poche unità (6.48-6.05). Contestualmente i ceppi 002 e 7.7.23 hanno raddoppiato la crescita (0.382-0.735 OD), mentre il ceppo 8.1.5 ha mostrato una capacità più bassa di crescere a pH neutro (0.433-0.545 OD). Di tutti gli altri ceppi che non hanno abbassato il pH al di sotto di 6, il ceppo 4.1.15 e il 4.3.1, pur riuscendo a crescere in queste condizioni, non hanno raddoppiato la propria biomassa, a differenza del ceppo 8.3.21 che non ha subito nessun rallentamento della crescita (0.305-

0.721 OD). I ceppi 011, 7.7.9 e 8.1.7 non riescono a crescere a pH 7 e subiscono un decremento della biomassa (0.388-0.184 OD).

Nella seconda settimana di esperimento i ceppi 7.7.23 e 8.1.5 hanno continuato ad abbassare il pH ad un valore inferiore a 4 (3.39 e 3.42), continuando a incrementare la propria crescita; al contrario il ceppo 002 ha subito un leggero rallentamento nell'abbassare il pH (4.34) pur non subendo nessuna alterazione del tasso di crescita rispetto alla settimana precedente (0.652-1.395 OD). Il ceppo 8.3.21, che nella prima settimana non si è dimostrato molto attivo, nella seconda settimana ha abbassato il pH al valore di 3.54, continuando a crescere in maniera esponenziale. Tra i ceppi poco resistenti, 011 e 8.1.7 hanno continuato a non riuscire ad abbassare il pH, né a crescere, mentre il ceppo 7.7.9 ha mostrato di essere riuscito ad adattarsi ad un pH neutro perché anch'esso ha cominciato sia ad abbassare il pH (6.29-5.33), sia a crescere (0.354-0.702 OD).

Le analisi fatte dopo 504 ore di esperimento hanno dimostrato che le alghe hanno cominciato ad uniformarsi per quanto riguarda l'abbassamento del pH raggiungendo un valore medio di 3.13 ± 0.13 pur mostrando un tasso di crescita differente (0.748-2.652 OD). I ceppi 7.7.23 e 8.8.5, ancora una volta si sono dimostrati essere quelli più attivi per quanto riguarda l'abbassamento del pH (2.90-2.81), anche se il ceppo 7.7.23 ha avuto un rallentamento della crescita essendo passato da una lettura colorimetrica di 1.045 OD a solo 1.333 OD, differentemente dal ceppo 8.1.5 che ha continuato ad avere una crescita esponenziale. Durante questa settimana di esperimento il ceppo 8.1.7 ha mostrato una ripresa della crescita dopo l'iniziale decrescita raddoppiando il numero delle cellule (0.379-0.877 OD), coadiuvato anche dall'abbassamento del pH da un valore di 6.14 a 4.64. L'unico ceppo che ha dimostrato scarsa capacità di estrarre i protoni e di acidificare il mezzo di coltura è risultato essere il ceppo 011, il quale non ha mostrato segni di ripresa poiché il pH ha continuato ad essere al di sopra di 6 (6.27) e il numero di cellule ha continuato a diminuire (0.264-0.252 OD).

Alla fine della quarta settimana i valori di pH misurati per i diversi ceppi erano tutti stabilizzati su valori ≤ 2.81 , eccetto che per il ceppo 8.1.7 che presentava un pH di 3.00 ed il ceppo 011 con un pH di 6.19. Per quanto riguarda la crescita, il ceppo 8.3.21 ha raddoppiato la biomassa passando da una lettura colorimetrica di 2.492 OD ad una di 7.060 OD; stessa cosa per il ceppo 8.1.7 (0.877-2.214 OD), mentre gli altri ceppi hanno continuato a crescere ma con un tasso di velocità leggermente più basso. Infine il ceppo 011 ha mostrato una leggera ripresa della crescita (0.252-0.356 OD).

Dopo 840 e 1008 ore di esperimento, il pH si è stabilizzato per quasi tutti i ceppi in un range che va da 2.91 a 2.17, eccetto che per il ceppo 011 che ha abbassato il pH ad un valore di 5.68. Anche i tassi di crescita sono risultati gli stessi della settimana precedente: il ceppo 8.1.7 è l'unico che continua ad avere più di un raddoppio in termini di lettura colorimetrica (2.214-10.590 OD), contrariamente al ceppo 011 che ha mostrato un solo raddoppio durante le due settimane (0.356-0.668 OD).

Il medesimo esperimento è stato allestito utilizzando gli stessi ceppi e un terreno di coltura Allen pH 6. Durante la prima settimana di esperimento tutti i ceppi hanno abbassato il pH ad un valore ≤ 3.89 , ed il ceppo più attivo si è dimostrato essere il 7.7.23 (3.40). Fa eccezione il ceppo 7.7.9 che ha raggiunto un valore di pH di 4.08. In termini di biomassa, tutti e 9 i ceppi hanno raddoppiato il numero di cellule (0.313 ± 0.035 OD- 0.704 ± 0.211 OD). Dopo 168 ore di esperimento i ceppi 002, 4.1.15, 4.3.1 e 7.7.23 hanno portato il pH del mezzo esterno ad un valore ≤ 2.99 , nonostante i ceppi 4.3.1 e 7.7.23 hanno subito una leggera diminuzione del tasso di crescita (0.562-0.856 OD; 0.752-1.263 OD). I ceppi 011, 7.7.9, 8.1.5, 8.1.7 e 8.3.21 non sono riusciti a portare il pH al di sotto di 3.00 e di questi il ceppo 7.7.9 ha subito anche un rallentamento della crescita (0.430-0.636 OD). Durante la terza e la quarta settimana, tutti i ceppi hanno stabilizzato il pH del terreno di coltura su un valore medio di 2.64 ± 0.14 anche se hanno mostrato diversi tassi di crescita: nell'arco di questi 15 giorni, i ceppi 002, 011, 4.3.1, 7.7.23, 8.1.5, 8.1.7 e 8.3.21 hanno avuto un solo raddoppio di crescita (2.316-6.325 OD; 1.568-4.030 OD; 0.856-2.383 OD; 1.263-4.490 OD; 1.769-4.980 OD; 1.423-4.880 OD; 1.556-4.205 OD), mentre i ceppi 4.1.15 e 7.7.9 hanno fatto un duplice raddoppio (1.167-6.040 OD; 0.636-3.860 OD). Dopo le ultime due settimane di esperimento il pH del terreno di coltura aveva un range che andava da 1.84 a 2.33 con il valore più basso registrato per il ceppo 4.1.15 e il valore più alto per il ceppo 7.7.23. In termini di biomassa, pur raggiungendo valori di OD molto elevati (Es. 15.100 OD per il ceppo 002, 14.420 OD per il ceppo 4.1.15), non è stato registrato un raddoppio completo del numero delle cellule per nessuno dei ceppi presi in esame.

Infine è stato allestito un terzo esperimento in cui è stata testata la capacità dei medesimi ceppi di abbassare il pH del mezzo di coltura partendo da un valore di 5. Alla fine della prima settimana tutti e 9 i ceppi hanno abbassato il pH ad un valore ≤ 3.71 e contestualmente sono cresciuti fino a raddoppiare il numero cellulare, eccetto che per il ceppo 4.1.15 che è passato solamente da un valore di 0.279 OD ad uno di 0.401 OD. Durante la settimana successiva alcuni ceppi (4.1.15, 7.7.9 e 8.1.7) hanno subito un leggero rallentamento nella propria attività, non avendo portato il valore del pH al di sotto di 3.00 come hanno fatto tutti

gli altri ceppi, nonostante il tasso di crescita non abbia subito nessun decremento rispetto a quello della settimana precedente. Così com'è successo per l'esperimento precedente, anche in questo caso durante la terza e quarta settimana di analisi i ceppi sono cresciuti più o meno con la stessa velocità (circa 2 generazioni), eccetto che per il ceppo 4.3.1 che ha subito un forte rallentamento (1.181-2.505 OD), e hanno portato il pH del terreno di coltura ad un valore medio di 2.61 ± 0.15 . Alla fine dell'esperimento, dopo 1008 ore, il range di pH andava da un valore di 1.99 a 2.55 ed il tasso di crescita è stato pressoché costante fatta eccezione che per il ceppo 4.3.1, che in 6 settimane di esperimento ha raggiunto solamente un valore di 4.925 OD.

C'è una correlazione positiva tra l'abbassamento del pH e il tasso di crescita: così come già dimostrato da Lowell C&Castenholz R.C. nel 2013, l'abbassamento del pH riflette un aumento graduale del tasso di crescita. In figura 13 sono riportate le relazioni tra il pH e la lettura colorimetrica per ogni ceppo analizzato e per ogni esperimento dopo due, quattro e sei settimane dall'inizio; in tutti e tre i grafici, la retta di correlazione tra i dati ha evidenziato una relazione inversamente proporzionale tra l'andamento del pH e quello della crescita. Il coefficiente angolare ricavato dalle tre funzioni varia significativamente a seconda della settimana di esperimento analizzata: esso è maggiormente negativo dopo le prime due settimane e aumenta man mano che passano le settimane; ciò avviene perché alla fine dell'esperimento tutti i ceppi algali bloccano il valore del pH in un range che va da 2 a 3 nonostante continuino a crescere.

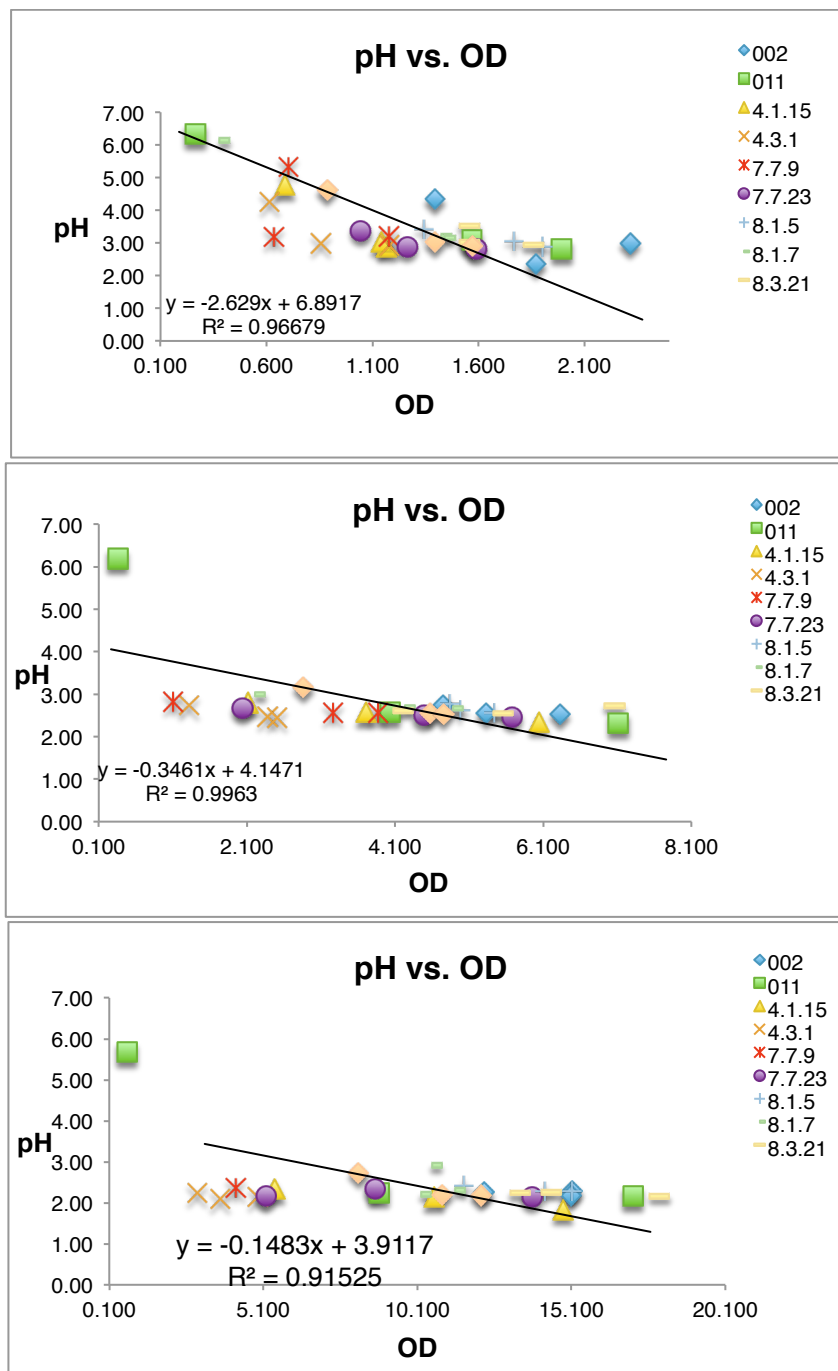


Fig. 13 Relazione tra il pH e gli OD dopo 2, 4 e 6 settimane dall'inizio dell'esperimento

In figura 14 invece, sono riportati gli andamenti della crescita e dell'abbassamento del pH del mezzo di coltura in funzione del tempo per tutti i ceppi analizzati e per ogni esperimento.

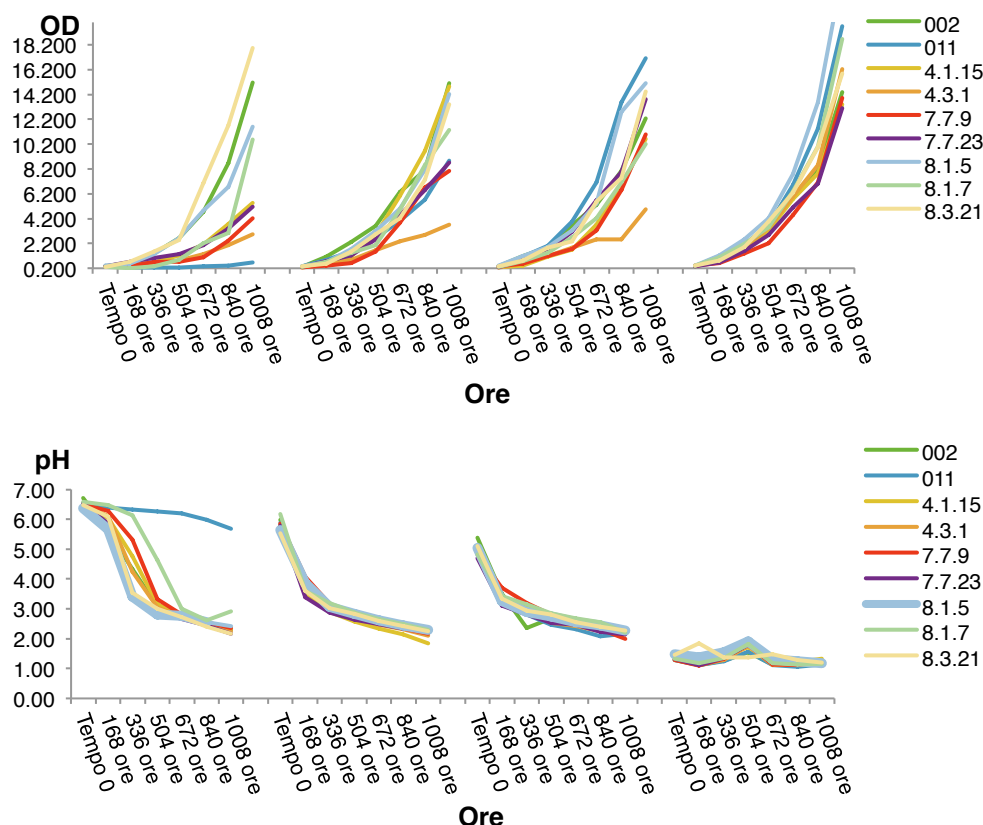


Fig. 14 Andamento del pH e della crescita in funzione del tempo per gli esperimenti con pH iniziale di 7, 6, 5 e 1.5.

Indipendentemente dal pH iniziale, in tutti gli esperimenti il valore limite minimo al quale le alghe hanno stabilizzato il pH del mezzo di coltura è stato di circa 2 ad eccezione del ceppo italiano 011 e di quello turco 8.1.7: il primo dimostra avere un andamento completamente diverso dagli altri ceppi, anche se i valori ottenuti nell'ultime settimane di analisi per quanto riguarda la capacità di portare il pH a livelli acidi hanno dimostrato che anch'esso possiede questa capacità, ma la sua reazione di risposta al mezzo di coltura neutro è nettamente più lenta rispetto agli altri; non si può escludere che nel giro di poche settimane anche il ceppo 011 porti il pH del mezzo di coltura in un range che va da 2 a 3. Come si nota dalla figura, il ceppo 8.1.7 inizialmente non ha dimostrato di avere la capacità di abbassare il pH, ma ben presto si è uniformato agli altri ceppi anche se alla fine della sesta settimana il pH misurato era leggermente più elevato rispetto agli altri (circa 3). La figura è mostrato l'andamento dell'abbassamento del pH nell'esperimento di controllo (pH 1.5) in cui si può ben notare che non c'è nessuna variazione significativa della concentrazione degli ioni H^+ nel mezzo di coltura; le oscillazioni che si notano durante le settimane di esperimento potrebbero essere dovute alla normale attività fisiologica respiratoria e fotosintetica delle alghe. In ultima analisi, per ogni ceppo, è stata valutata e confrontata la velocità di crescita e la velocità di

portare il pH a valori acidi, utilizzando i coefficienti angolari ottenuti dalle rette di tendenza nei quattro diversi esperimenti (Fig. 15).

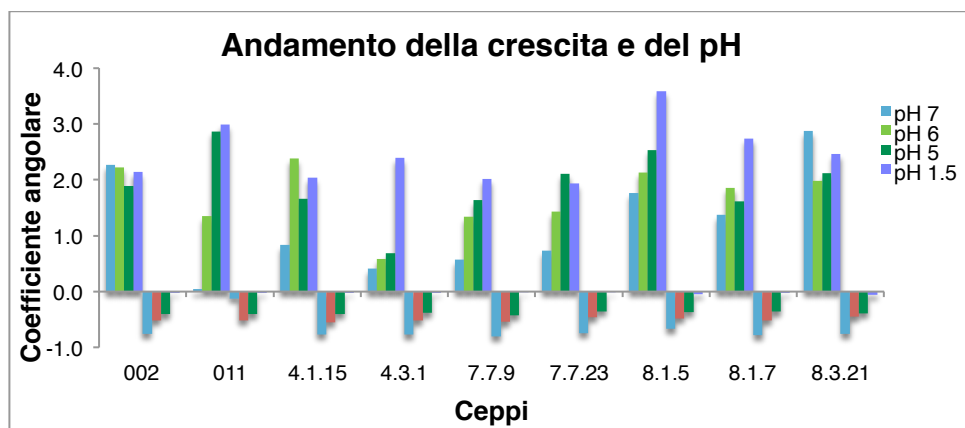


Fig. 15 Rappresentazione dei coefficienti angolari in relazione alla velocità di crescita e velocità di abbassamento del pH per i quattro esperimenti e per i nove ceppi considerati.

I ceppi sembrano avere una tendenza simile per quanto riguarda l'abbassamento del pH, con un coefficiente angolare maggiormente negativo per l'esperimento a pH 7; esso aumenta nell'esperimento a pH 6 e maggiormente in quello a pH 5. Il coefficiente angolare estrapolato dalle rette di tendenza per l'esperimento di controllo (pH 1.5) risulta essere quasi zero per tutti i ceppi a dimostrazione che a questo pH non c'è variazione della concentrazione degli ioni H^+ nel mezzo di coltura. Fa eccezione il ceppo 011 il cui coefficiente angolare è quasi zero perché c'è stata solo una piccola variazione del pH dalla quarta settimana di esperimento. Nonostante i ceppi sembra siano tutti simili per quanto riguarda la capacità di eliminare l'eccesso di ioni H^+ dalla cellula, confrontando le curve di crescita con l'esperimento di controllo (pH 1.5), esistono delle variazioni per quanto riguarda il tasso di crescita: il ceppo 002 contemporaneamente ad abbassare il pH, riesce a crescere senza subire nessun rallentamento della crescita; tutti gli altri ceppi subiscono sicuramente un rallentamento della crescita poiché, come si nota in figura, i coefficienti angolare delle rette di tendenza sono nettamente inferiori rispetto al controllo. Interessante notare che il ceppo turco 4.3.1, nonostante presenta una buona attività per quanto riguarda l'abbassamento del pH, paragonabile agli altri ceppi, la crescita sembra rallentata in tutti gli esperimenti. Il ceppo 011 non cresce ad un pH di 7, mentre il pH 5 sembra non influire sul tasso di crescita. Infine, analizzando i dati ottenuti per quanto riguarda il ceppo islandese 8.3.21, il pH 7 del primo esperimento sembra aver stimolato la crescita di questo ceppo; di fatto la linea di tendenza che la riguarda mostra un più elevato coefficiente angolare rispetto a quello ottenuto per gli esperimenti a pH 6, pH 5 e l'esperimento di controllo a pH 1.5

4.3.1 PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS (PCA)

La PCA è stata applicata per valutare la diverse capacità di adattamento e di crescita a vari condizioni di pH di ceppi algali provenienti da le stazioni idrotermali italiane, islandesi e turche.

Dall'analisi effettuata due componenti sono necessarie per spiegare la variabilità totale delle caratteristiche analizzate. Gli autovalori (eigenvalues) della matrice di covarianza mostrano che il set delle due componenti principali (PCs) stima il 98.49% della varianza totale, con PC1 (63.04%) e PC2 (35.45%). L'OD e la fluorescenza sono positivamente correlate alla PC1 mentre il pH è correlato positivamente alla PC2.

La PCA ha messo in luce la diversa capacità di crescita dei vari ceppi algali testati in diverse condizioni di pH del terreno di crescita e del tempo di coltura. Lo shift lungo la PC2 indica una diminuzione del pH nel terreno di crescita mentre lo shift lungo la PC1 un aumento della crescita algale (Fig. 16).

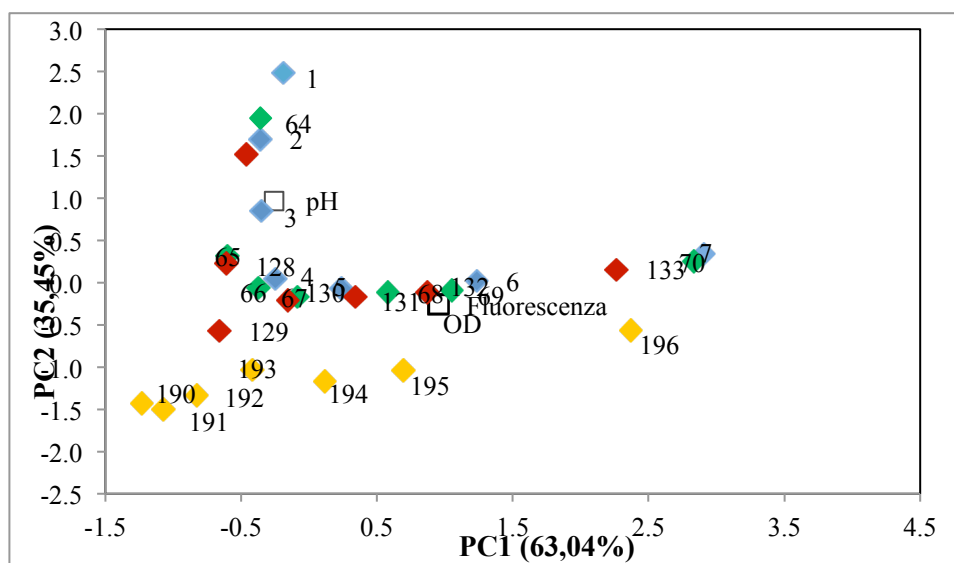


Fig. 16 PCA per nove ceppi valutati nella capacità di abbassare il pH del mezzo esterno

Il ceppo 2 quando viene posto in terreno con pH 7, 6 e 5 mostra uno shift lungo la PC2 con una diminuzione del pH del terreno e successivamente un incremento nella crescita con uno shift lungo la PC1. Dopo 1008 ore il ceppo 2 raggiunge una crescita maggiore rispetto al ceppo cresciuto a pH 1,5.

Il ceppo 11 a pH 7,0 mostra una ridottissima crescita e una ridotta diminuzione del pH. Quando viene posto in terreno a pH 6 e 5 si assiste una riduzione del pH e un aumento della

crescita che risulta maggiore nel terreno a pH 5.0. La crescita di questo ceppo algale dopo 1008 ore di incubazione in questi terreni non raggiunge mai quella del ceppo posto in terreno a pH 1,5.

Il ceppo 4.1.5 a pH 7, 6 e 5 mostra una diminuzione del pH ed un aumento della crescita che raggiunge valori massimi nel terreno a pH 6 dopo 1008 ore rispetto al ceppo cresciuto a pH 1.5.

Il ceppo 4.3.1 mostra una crescita ridotta quando posto in terreno a pH 7, 6 e 5 anche se è possibile osservare un abbassamento del pH nel terreno di coltura.

Il ceppo 7.7.9 a pH 7, 6 e 5 mostra una diminuzione del pH ed un aumento della crescita che raggiunge valori massimi nel terreno a pH 5 dopo 1008 ore rispetto al ceppo cresciuto a pH 1.5, mentre nel ceppo 7.7.23 osserviamo dopo 1008 ore di coltura una crescita maggiore rispetto al ceppo cresciuto a pH 1.5.

Il ceppo 8.1.5 a pH 1,5 mostra una crescita maggiore rispetto agli altri ceppi algali posti nelle stesse condizioni di pH. Questo ceppo nelle altre condizioni di pH testate induce una diminuzione del pH del mezzo ed un aumento della crescita che non è mai paragonabile a quella del ceppo cresciuto a pH 1,5. Analogo comportamento è possibile osservarlo nel ceppo algale 8.1.7.

Il ceppo 8.3.21 a pH 7, 6 e 5 mostra una diminuzione del pH ed un aumento della crescita che raggiunge valori maggiori rispetto al ceppo cresciuto a pH 1.5 dopo 1008 nel terreno a pH 7 e 5 (Fig.)

5. DISCUSSIONI

L'analisi filogenetica pone in stretta relazione le popolazioni islandesi, russe e giapponesi, suggerendo un'origine comune delle popolazioni del Nord-est asiatico e dell'Islanda. Ad ogni modo, non è possibile avanzare ipotesi probabilistiche in merito a questo gruppo di organismi, dal momento che manca ad oggi un campionamento esteso nelle aree delle isole Kurili e Kunashir, per le quali è presente un unico individuo non rappresentativo della popolazione.

La presenza di *G. sulphuraria* in Islanda e in Turchia conferma la filogenesi delle *Cyanidiophyceae* già evidenziata da Ciniglia et al. nel 2004, rafforzando il subclade di *Galdieria*-A conferendo a *G. sulphuraria* un carattere moderatamente cosmopolita, data la sua presenza in tutte le stazioni acido termali mondiali campionate, con l'unica eccezione rappresentata dal Giappone.

I risultati ottenuti, così, dimostrano che *G. phlegrea* non è una specie endemica del territorio italiano e l'intero clade è supportato da un valore di bootstrap molto elevato (95%).

In queste analisi si conferma quanto già evidenziato dalla letteratura (Toplin et al., 2008), in merito alla limitatissima dispersione di *C. caldarium*; di fatto, nonostante i numerosi ed estesi campionamenti eseguiti presso stazioni termali ed acide dislocate nei vari continenti, è stata rinvenuta solo in pochi territori, quali Italia, Indonesia (Java) e Giappone, lasciando presumere che sia una specie più esigente delle altre o che preferisca condizioni ecologiche più restrittive rispetto alle altre *Cyanidiophyceae* od altresì che subisca la competizione con altri organismi acidofili e termofili che con essa convivono (tab.).

	Italia	America (YNP)	Nuova Zelanda	Giappone	Russia	Islanda	Turchia
<i>G. sulphuraria</i>	OK	OK	OK	-	OK	OK	OK
<i>G. phlegraea</i>	OK	-	-	-	-	-	OK
<i>G. daedala</i>	-	-	-	-	OK	OK	-
<i>G. partita</i>	-	-	-	-	OK	OK	-
<i>G. maxima</i>	-	-	-	-	OK	OK	OK
<i>C. merolae</i>	OK	OK	OK	OK	-	-	OK
<i>C. caldarium</i>	OK	-	-	OK	-	-	OK

Tab..... Areali di distribuzione schematizzati di tutte le specie appartenenti alla classe delle *Cyanidiophyceae*

I tradizionali metodi di analisi filogenetica applicati per ricostruire la storia genealogica dalla variazione genetica delle *Cyanidiopyceae* non forniscono gli strumenti necessari per comprendere l'evoluzione intraspecifica e interspecifica di questo gruppo. Costruendo un network di aplotipi mediante il software TCS ed applicando su di essi la procedura analitica nota come "Nested clade analyses (NCA)" è possibile testare l'ipotesi nulla che un determinato gruppo di organismi campionato da diversi luoghi geografici sia derivato da una singola linea evolutiva. Il software TCS collassa le sequenze da analizzare in aplotipi e ne calcola la frequenza nel campione, producendo infine un network non radicato; le relazioni tra i singoli aplotipi appartenenti allo stesso filotipo sono stimate sulla base di un set plausibile al 95% fornito dal programma. Questo metodo consente di indagare, meglio dei metodi filogenetici classici, le relazioni tra aplotipi strettamente correlati, come sono spesso quelli individuati in indagini intraspecifiche (Posada & Crandall, 2001). Esso ad esempio consente ad un aplotipo individuato come ancestrale di occupare una posizione centrale rispetto a quelli da esso derivati, contrariamente a quanto avviene per i metodi di costruzione di alberi, che collocano tutti gli elementi indagati come rami terminali (Posada & Crandall, 2001).

La costruzione di network di aplotipi per *G. sulphuraria*, basato sul criterio della parsimonia, ha evidenziato la presenza di cinque gruppi aplotipici separati, le cui connessioni non possono essere verificate, dal momento che il numero di mutazioni che separa i distinti network è superiore al numero di connessioni mutazionali tra coppie di sequenze giustificato dal criterio della parsimonia con una probabilità fissata al 95%. La diversità genetica tra ed all'interno dei diversi network non è sempre correlabile con la loro distribuzione geografica, com'è evidenziato anche dal test di correlazione di Mantel. In particolare tra i cinque aplogruppi, distinguiamo un aplogruppo di provenienza neozelandese, un aplogruppo in cui la popolazione islandese è collegata ad alcuni aplotipi turchi separati tra loro da pochi step mutazionali, un network che raggruppa gli aplotipi italiani ad un certo numero di aplotipi turchi, un network che connette gli aplotipi americani ed alcuni aplotipi di Taiwan ed un ultimo network comprendente la maggioranza degli aplotipi di Taiwan connessi all'unico aplotipo di *G. partita* della Kamchatka. Secondo tale disposizione dei network, sembrerebbe che *G. sulphuraria* sia dotata di una significativa capacità di dispersione, oltrepassando anche i limiti definiti dagli oceani; c'è da dire però che la separazione tra i network indicherebbe passati eventi di frammentazione allopatrica, probabilmente correlati all'evoluzione della geografia terrestre. Osservando i singoli

network, è indispensabile fare riferimento agli unici aplotipi disponibili per la popolazione russa, *G. daedala* e *G. partita*, che clusterizzano in network separati: *G. partita* si raggruppa con la maggioranza degli aplotipi di Taiwan, mentre *G. daedala* è collegata alla totalità degli aplotipi islandesi insieme ad alcuni aplotipi di origine turca. Da un punto di vista genetico, ciò induce ad ipotizzare la reale esistenza di linee evolutive aggiuntive di queste due specie, probabilmente sottostimate dall'assenza di isolati appartenenti a territori intermedi. Analizzando il network GS-AIV, costituito dalle popolazioni aplotipiche italiane e turche, si può notare che l'aplotipo che si posiziona al centro del network, la cui dimensione esprime la frequenza aplotipica nel campione, è condiviso da entrambi i luoghi geografici in questione; ciò avvalorava l'ipotesi della reale capacità di dispersione su medie e lunghe distanze di *G. sulphuraria* e ancora una volta questi dati invitano fortemente ad effettuare campionamenti nelle aree intermedie onde verificare se il passato flusso genico o se la passata dispersione è stata seguita da eventi di estinzione o se ancora oggi queste due aree geografiche sono in continuità.

I risultati ottenuti dalla costruzione del network di aplotipi e dalla Nested Clade Analysis per *G. maxima*, evidenziano che la popolazione neozelandese sembra essersi separata dalle altre popolazioni che si identificano con questa specie in quanto forma un network separato che non presenta connessioni con gli altri. Così come discusso per *G. sulphuraria*, anche per *G. maxima* si potrebbe ipotizzare un evento passato di frammentazione allopatrica dovuto alla posizione geografica della Nuova Zelanda. L'isolamento di questo sito geografico potrebbe essere collegato al fatto che le *Cyanidiophyceae* non sopravvivono in acqua di mare dove la salinità è molto elevata ed il pH di aggira intorno a valori di 8. La presenza di diversi aplotipi nelle altre regioni geografiche. Analizzando le altre regioni geografiche (Russia, Giappone, Turchia e Islanda), si evince che potrebbero esistere diverse popolazioni di *G. maxima* in queste regioni: secondo i risultati del TCS, in Turchia e in Giappone coesistono due popolazioni di questa specie di cui una che condivide gli aplotipi con l'unico isolato di *G. maxima* russo con alcuni isolati giapponesi; l'altra popolazione turca è collegata alla popolazione islandese con cui condivide anche un aplotipo (1B) ed alla seconda popolazione giapponese che differisce per qualche step mutazionale in più. La presenza in Turchia di due diverse popolazioni, una collegata alle popolazioni occidentali e l'altra alle popolazioni orientali, potrebbe far ipotizzare che questa regione sia stata il centro di origine di *G. maxima*; questa ipotesi potrebbe essere supportata dal fatto che l'origine del territorio turco risale ai tempi della Gondwana e durante la sua lunga storia evolutiva le popolazioni di *G. maxima* potrebbero essersi differenziate in due differenti popolazioni;

l'assenza, poi, di un'elevata attività vulcanica, contrariamente all'Islanda e al Giappone, notoriamente attivi da un punto di vista eruttivo, renderebbe questo territorio più stabile e favorevole per la crescita e la differenziazione di queste microalghe.

I risultati ottenuti dalla costruzione del network di aplotipi, insieme con la Nested Clade Analysis sembrano dimostrare che le diverse popolazioni di *C. merolae* distribuite in America, Italia, Turchia ed Indonesia, appartengono alla stessa linea evolutiva: la distanza tra i vari aplotipi è per la maggior parte dei casi di un solo passo evolutivo. Che gli isolati campionati nelle diverse stazioni termali indicate in precedenza siano molto simili tra loro era stato già messo in luce dalle analisi filogenetiche: l'albero costruito sulla base delle sequenze dell'*rbcL*, presenta una ridotta dimensione dei rami in questa porzione di albero. Alla luce di questi risultati si potrebbe ipotizzare che il gene che codifica per la subunità maggiore della RubisCo sia molto conservato in *C. merolae* e che sia soggetto ad un bassissimo tasso mutazionale; questa potrebbe essere legato all'ambiente in cui vive questa specie: i campionamenti effettuati nello Yellowstone National Park, ad esempio, hanno individuato *C. merolae* in quelle zone più vicine ad una fonte acquatica, decisamente un'ambiente più costante da un punto di vista ecologico rispetto ad un habitat terrestre o endolitico dove si ritrovano le altre specie di *Cyanidiophyceae* (Skorupa et al., 2013). La spiegazione alternativa potrebbe essere che questa specie sia dotata di una moderata capacità di spostamento ed è per questo che lo stesso aplotipo è condiviso dalle regioni americane, europee ed asiatiche; rimane però il fatto che non è presente in altri siti acido termali probabilmente perché è una specie più delicata e non riesce a sopravvivere in tutte le condizioni ecologiche che un sito acido termale può offrire.

6. BIBLIOGRAFIA

1. **Albertano P., Pinto G., Santisi S., Taddei R. (1981)** *Spermatozopsis acidophila* Kalina (Chlorophyta, Volvocales), a little Known alga from highly acidic environments. Giorn. Bot. Ital. **115: 65-76**
2. **Albertano P., Pinto G., Pollio A., & Taddei R. (1990)** Morphology, ultrastructure and ecology of an acidophilic alga *Pseudococcomyxa simplex* (Mainx) Fott (Chlorococcales). Arch. Hydrobiol., Algol. Stud. **37: 401-408**
3. **Albertano P., Pinto G., Pollio A. (1994)** Ecophysiology and ultrastructure of an acidophilic species of *Ochromonas* (*Chrysophyceae*, Ochromonadales). Arch. Protistenkd. **144: 75-82**
4. **Albertano P., Ciniglia C., Pinto G., Pollio A. 2000.** The taxonomic position of Cyanidium, Cyanidioschyzon and Galdieria: an update. Hydrobiologia **433: 137-143**
5. **Allen, M. B. (1959)** Studies with *Cyanidium caldarium*, an anomalously pigmented chlorophyte. Arch. Mikrobiol. **32, 270-277**
6. **Beard SJ, Handley BA, Hayes PK & Walsby AE (1999)** The diversity of gas vesicle genes in *Planktothrix rubescens* from Lake Zürich. Microbiology **145: 2757-2768.**
7. **Beardall J. & Entwistle L. (1984)** Internal pH of the obligate acidophile *Cyanidium caldarium* Geitler (Rhodophyta). Phycologia **23:397-399**
8. **Brock TD (1978)** The genus *Cyanidium*. In Thermophilic microorganisms and life at high temperatures Edited by: Starr PM. New York, Springer-Verlag; **1978:255-301.**
9. **Bruen, T. C., Philippe, H. & Bryant, D. (2006)** A simple and robust statistical test for detecting the presence of recombination. Genetics **172:2665-81.**
10. **Chapman, C. L., Bourke, P. D., & Wright, J. J. (2001).** Spatial eigenmodes and synchronous oscillation: coincidence detection in simulated cerebral cortex. Journal of Mathematical Biology, **45, 57**
11. **Ciniglia C., Yoon H.S., Pollio A., Pinto G., Bhattacharya D. (2004)** Hidden biodiversity of the extremophilic Cyanidiales red algae. Molecular Ecology **13: 1827-1838.**
12. **D'Alelio D & Gandolfi A. (2012)** Recombination signals in *rpoC1* suggest gene flow between *Planktothrix* (Cyanoprokaryota) species. J Phycol **48: 1424-1432.**
13. **Davis, J. C., & Sampson, R. J. (2002).** Statistics and data analysis in geology. New York: Wiley
14. **De Luca P, Taddei R (1970).** Due alghe delle fumarole acide dei Campi Flegrei (Napoli): *Cyanidium caldarium*? Delpinoa **10/11: 79-89.**

15. **De Luca P, Moretti A, Musacchio A, Taddei R (1972)** Il primo reperto di «*Cyanidium caldarium*» (Acquasanta, Italia, 1839) e due distinte «forme» di quest'alga. *Delpinoa* **14-15: 3-11**.
16. **De Luca P., Taddei R, Varano, L. (1978).** "Cyanidioschyzon merolae": a new alga of thermal acidic environments. *Webbia* **33: 37-44**.
17. **Didelot X & Maiden MCJ (2010)** Impact of recombination on bacterial evolution. *Trends Microbiol* **18: 315-322**
18. **Doemel W N, Brock M L (1971)** The physiological ecology of *C. Caldarium*. *Journal of General Microbiology*, **67: 17-32**
19. **Enami I., Akutsu H. and Kyogoku Y. (1986)** Intracellular pH regulation in an acidophilic unicellular alga, *Cyanidium caldarium*: P31-NMR determination of intracellular pH. *Plant Cell Physiol* **27: 1351-1359**
20. **Feil, E. J., Maynard Smith, J., Enright, M. C. & Spratt, B. G. (2000)** Estimating recombinational parameters in *Streptococcus pneumoniae* from multilocus sequence typing data. *Genetics* **154:1439–50**.
21. **Finlay B.J. (2002)** Global dispersal of free-living microbial eukaryote species. *Science* **296: 1061–1063**
22. **Finlay B.J., Esteban G.F. and Fenchel T. (2004)** Protist diversity is different? *Protist* **155: 15–22**.
23. **Fuggi A., Pinto G., Pollio A. & Taddei R. (1988)** Effects of NaCl, Na₂SO₄, H₂SO₄, and glucose on growth, photosynthesis and respiration in the acidophilic alga *Dunaliella acidophila* (Volvocales, Chlorophyta). *Phycologia*. **27: 334-339**
24. **Fuggi A., Pinto G., Pollio A., Taddei R. (1988).** The role of glycerol in osmoregulation of the acidophilic alga *Dunaliella acidophila* (Volvocales, Chlorophyta): effect of the solute stress on photosynthesis, respiration and glycerol synthesis. *Phycologia* **27 (4): 439-436**
25. **Gao K. & Zou D (2001)** Photosynthetic bicarbonate utilization by a terrestrial cyanobacterium, *Nostoc flagelliforme* (Cyanophyceae) *J. Phycol* **37: 768-771**
26. **Geitler L., Ruttner F. (1935)** Die Cyanophyceen der deutschen limnologischen Sunda expedition, ecc. *Arch. Hydrobiol, suppl.* **14: 371-481**
27. **Gross W., Oesterhelt C. (1999)** Ecophysiological Studies on the Red Alga *Galdieria sulphuraria* Isolated from Southwest Iceland. *Plant Biology* **1: 694-700**.

28. **Gross W., Heilmann I., Lenze D., Schnarrenberger C. 2001.** Biogeography of the Cyanidiaceae (Rhodophyta) based on 18S ribosomal RNA sequence data. *European Journal of Phycology* **36**: 275-280.
29. **Göncüoğlu M.C., Kozlu H. and Dirik K. 1997.** Pre-Alpine and Alpine terranes in Turkey: explanatory notes to the terrane map of Turkey. *Ann. Geol. Pays Helleniques* **37**: 515-536
30. **Humbert JF & Le Berre B (2001)** Genetic diversity in two species of freshwater Cyanobacteria, *Planktothrix (Oscillatoria) rubescens* and *P. agardhii*. *Arch Hydrobiol* **532 150**: 197–206.
31. **Huson, D. H. (1998).** Splitstree: analyzing and visualizing evolutionary data. *Bioinformatics* **14**:68–73.
32. **Kristiansen J (2001a)** Biogeography of silica-scaled chrysophytes. *Nova Hedwigia Beih* **122**: 23-39
33. **Lin S, Wu ZX, Yu GL, Zhu ML, Yu BS & Li RH (2010)** Genetic diversity and molecular phylogeny of *Planktothrix* (Oscillatoriales, Cyanobacteria) strains from China. *Harmful Algae* **9**: 87–97.
34. **Lowell C. & Castenholz R.W.** The lowering of external pH in confined environments by thermo-acidophilic algae (class: *Cyanidiophyceae*). *Environmental Microbiology Reports* **5(5)**: 660-664
35. **Martin, D. P., Lemey, P., Lott, M., Moulton, V., Posada, D. & Lefevre, P. (2010)** RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics* **26**:2462–3.
36. **Merola A, Castaldo R, Gambardella P, Musacchio A, Taddei R (1981)** Revision of *Cyanidium caldarium*: three species of acidophilic algae. *Giornale botanico italiano*, **115**: 189-195
37. **Oarga1 A (2009)** Life in extreme environments **9**
38. **Ott FD, Seckbach J (1994)** New classification for the genus *Cyanidium* Geilert 1933. In: *Evolutionary Pathway and Enigmatic Algae: Cyanidium caldarium and Related Cells*, pp 142-152. Kluwer Academic Publisher, London
39. **Pinto G. & Taddei R. (1977)** Le alghe dei suoli acidi italiani. *Delpinoa* **18-19**: 77-106
40. **Pinto G., Albertano P., Ciniglia C., Cozzolino S., Pollio A., Yoon H.S., & Battacharya D. (2003)** Comparative approaches to the taxonomy of the genus *Galdieria merolae*. *Cryptogamie Algologie*, **24 (1)**: 13-32

41. **Pinto G., Ciniglia C., Cascone C., Pollio A. (2006)** Species composition of Cyanidiales assemblages in Pisciarelli (Campi Flegrei, Italy), and description of *Galdieria phlegrea* sp. *Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments* Seckbach, Joseph (Ed.)
42. **Sentsova OY (1991)** Diversity of acido-thermophilic unicellular algae of the genus *Galdieria* (Rhodophyta, Cyanidiophyceae). *Botanicheskii Zhurnal*, **76:69-79**
43. **Skorupa D.J., Reeb V., Castenholz R.W., Bhattacharya D. and McDermott T.R. (2013)** Cyanidiales diversity in Yellowstone National Park. *Lett Appl Microbiol* **57(5): 459-466**
44. **Suda S, Watanabe MM, Otsuka S, Mahakahant A, Yongmanitchai W, Nopartnaraporn N, Liu Y & 579 Day JG (2002)** Taxonomic revision of water-bloom-forming species of oscillatoriod cyanobacteria. *Int J Syst Evol Micr* **580 52: 1577–1595**.
45. **Toplin J.A., Norris T.B., Lehr C.R., McDermott T.R., Castenholz R.W. 2008.** Biogeographic and Phylogenetic Diversity of Thermoacidophilic Cyanidiales in Yellowstone National Park, Japan and New Zealand. *Applied and Environmental Microbiology* **74: 2822. DOI: 10.1128/AEM.02741-07**.
46. **Yoon H.S., Hackett J.D., Ciniglia C., Battacherya D. (2004)** A molecular timeline for the origin of photosynthetic eukaryotes. *Molecular Biology and evolution*, **21: 809-818**
47. **Zierenberg R.A., Adams M.W.W., and Arp A.J. (2000)** Life in extreme environments: Hydrothermal vents **97 24:12961–12962**